

**RITA MAURÍCIO RODRIGUES**

**CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DE BIOFILMES DE  
ESPESSURA CONTROLADA - IDADE DO BIOFILME**

**LISBOA**

**2009**



**ISBN**

© Month 2009

**RITA MAURÍCIO RODRIGUES**

**LEGAL DEPOSIT Nº.**

**ISBN: 978-972-8893-21-7**

Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente  
Faculdade de Ciências e Tecnologia  
Universidade Nova de Lisboa  
Campus da Caparica  
Quinta da Torre  
2029-516 Caparica  
Portugal



# **CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DE BIOFILMES DE ESPESSURA CONTROLADA - IDADE DO BIOFILME**

Dissertação apresentada para obtenção do grau  
de Doutor em Engenharia Sanitária pela  
Universidade Nova de Lisboa,  
Faculdade de Ciências e Tecnologia

**LISBOA  
2009**



## **DECLARAÇÃO DO AUTOR**

A preparação deste manuscrito, incluindo a sua concepção, execução técnica interpretação dos resultados e preparação de artigos publicados incluídos nesta dissertação foram preparados de acordo com o nº. 2 do art. 8 do Decreto-Lei nº. 388/70.

Rita Maurício Rodrigues





## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de expressar os meus sinceros agradecimentos às seguintes pessoas:

Ao Prof. Doutor Fernando Santana pela orientação desta tese, pela confiança depositada durante todos estes anos de trabalho em comum, pelas oportunidades que me tem dado, pela incondicional disponibilidade e principalmente pela grande amizade e carinho que sempre fez questão de demonstrar.

À Prof. Doutora Leonor Amaral pelas discussões científicas e ajuda na elaboração deste trabalho. À Prof. Leonor gostaria ainda de agradecer a incondicional amizade que sempre demonstrou durante todos estes anos de trabalho em comum, o espírito de cooperação e entreajuda e por todas as conversas de apoio nos momentos menos bons da preparação desta dissertação.

Ao Prof. Doutor Rui Ganho pelas oportunidades que me tem dado e pela amizade e carinho que sempre demonstrou.

Ao Prof. Doutor Carlos Dias pela ajuda e cedência de equipamento usado no desenvolvimento desta tese.

Ao Prof. Doutor João Pais pela ajuda e disponibilidade na realização das fotografias através de microscopia electrónica.

Um agradecimento muito especial ao meu colega Mário Diniz pela camaradagem, espírito de entreajuda e enorme amizade que se tornaram fundamentais e imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Ao Francisco Silva, José Drumond, Jorge Imaginário e Luísa Caldeira pela enorme ajuda dada em todo o trabalho experimental e preparação final da tese. À Celma Padamo pela amizade e apoio que sempre me deu.

Aos meus amigos e família pela ajuda, apoio e interesse com que sempre acompanharam a evolução deste trabalho.

Finalmente, um agradecimento muito especial ao Vitinho e aos meus pais pelo apoio incondicional na realização deste trabalho.

Gostaria de dedicar este trabalho ao meu filho Vasco e ao meu avô João.



## Abstract

Biofilms have been object of extensive studies, mainly focused on the study of the kinetic process (reaction, diffusion or both) and modelling, or on the study of its characteristics (structure, density, thickness), Boaventura e Rodrigues, (1998), Deront *et al.*, (1998), Hinson *et al.*, (1996), e Seker *et al.*, (1995), Wasche *et al.*, (2002).

With the exception of some strict kinetic formalisms, the biofilm thickness constitutes a basic parameter for analysis of the mechanisms of mass transfer, namely implications to the penetration (total or partial) of liquid and gaseous phases in the colonies that constitute the biofilm itself.

Although incorporating biofilm thickness, most of the works on this domain, are based on biofilm thickness increase with time, in result of microbiological growth, i.e. the biofilm thickness is a self-controlled parameter.

The present work aimed at the study of the influence of the biofilm thickness in the degradation process of an organic substrate. The work included the construction of a special experimental device to perform with biofilms with constant (in time) thicknesses. The measure of biofilm thickness was also made indirectly by introducing the concept of biofilm age.

The degradation of a simple organic substrate was studied by keeping constant the biofilm age, through a set of parallel reactors, and with the substitution of the support with pre-formed biofilms.

Another objective of this work was the development of a non-destructive, on line, method for biofilm thickness evaluation. The method is based on the measurement of the electric capacitance of a field that includes the biofilm. This method has allowed for the analysis of the biofilm without its removal from the support, avoiding the limitations of other methods that perform separately from the bioreactors (Gjaltema, *et al.*, 1995).

Results have shown the importance of biofilm age and consequently its thickness as a relevant parameter in the biodegradation process and that it might be advantageous to operate fixed biomass systems where thickness is a controlled parameter.



## Resumo

Os biofilmes têm sido objecto de extensa actividade de investigação, principalmente centrada quer no estudo do tipo de cinética (reaccional, difusional ou mista) e respectiva modelação, quer no conhecimento das suas características (estrutura, densidade, espessura) de que se salientam os trabalhos de Boaventura e Rodrigues, (1998), Deront *et al.*, (1998), Hinson *et al.*, (1996), e Seker *et al.*, (1995), Wasche *et al.*, (2002)

Exceptuando os formalismos cinéticos estritamente reaccionais, a espessura do biofilme constitui um parâmetro fundamental para análise dos mecanismos de transferência de massa, designadamente das implicações da penetração (total ou parcial) da fase líquida e gasosa nas colónias que constituem o biofilme.

A generalidade dos trabalhos de teorização deste domínio, embora incorporem a influência da espessura do biofilme, têm-se baseado em resultados de experiências em que a espessura aumenta progressivamente no tempo, em resultado do crescimento microbiológico verificado no filme, isto é, a espessura é um parâmetro que se autocontrola.

O presente trabalho pretendeu estudar a influência da espessura do biofilme no processo de degradação de um substrato orgânico, através de espessuras constantes no tempo, obtidas com um dispositivo experimental especialmente concebido para produzir biofilmes de determinada espessura. Utilizando-se o tempo como medida indirecta deste parâmetro, introduziu-se o conceito de “idade do biofilme”.

Assim, através de um conjunto de reactores em paralelo, e por substituição do suporte com filmes pré-formados, estudou-se a degradação de um substrato orgânico simples mantendo constante a idade do biofilme.

O presente trabalho teve também como objectivo o desenvolvimento de um método de medição “on-line”, não invasivo, da espessura do biofilme. O método, baseado na medição da capacidade eléctrica de um campo que incorpora o biofilme, para além de não implicar a remoção da biomassa do suporte para efectuar medições, não tem as limitações de outros realizados em dispositivos separados do reactor em estudo (Gjaltema, *et al.*, 1995).

Os resultados obtidos, permitiram constatar que a idade do biofilme e, consequentemente, a sua espessura, é um parâmetro que desempenha um papel fundamental na degradação de um substrato orgânico, podendo ser vantajoso explorar sistemas de biomassa fixa em que a espessura se regule e não seja determinada apenas pelo natural autocontrolo.



## SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

A – área do biodisco ( $L^2$ )

AFM - microscopia atómica

b – taxa de respiração endógena ( $T^{-1}$ )

BbMs - *biomass based models* ou modelos baseados na biomassa

BAP - produtos associados à biomassa

C - capacidade eléctrica (Farad) – ( $M^{-1} L^{-2} T^4 I^2$ )

$C_S$  – concentração de substrato ( $M L^{-3}$ )

$C_X$  - concentração de biomassa ( $M L^{-3}$ )

$C_N$  – concentração de azoto ( $M L^{-3}$ )

$C_O$  – concentração de oxigénio ( $M L^{-3}$ )

CA - *cellular automaton* ou célula autónoma

$CBO_5$  - carência bioquímica de oxigénio ( $M L^{-3}$ )

CLSM - microscopia laser confocal de varrimento

CQO - carência química de oxigénio ( $M L^{-3}$ )

CI - carbono inorgânico ( $M L^{-3}$ )

CT - carbono total ( $M L^{-3}$ )

D – coeficiente de difusão ( $L^2 T^{-1}$ )

$D_f$  – coeficiente de difusão ( $L^2 T^{-1}$ )

DOC – carbono orgânico dissolvido ( $M L^{-3}$ )

e - constante dieléctrica do meio ( $M^{-1} L^{-3} T^4 I^2$ )

$\epsilon_0$  - permissividade do vazio ( $M^{-1} L^{-3} T^4 I^2$ )

EPS - substâncias poliméricas extracelulares

G – coeficiente de difusão da lactose ( $L^2 T^{-1}$ )

IbM - *individual-based modelling* ou modelos baseados no indivíduo

$I_d$  – Idade do biofilme (T)

$J_S$  – fluxo de substrato ( $M L^{-2} T^{-1}$ )

$J_x$  - fluxo de massa ( $M L^{-2} T^{-1}$ )

K – constante de degradação do substrato ( $L T^{-1}$ )

$K_i$  - constante de inibição do substrato ( $L T^{-1}$ )

$K_S$  – constante de saturação de Monod ( $M L^{-3}$ )

$L_f$  ou esp. - espessura do biofilme (L)

$M_X$  - quantidade de biomassa (matéria seca) (M)

r - taxa de reacção ( $M L^{-3} T^{-1}$ )

$r_A$  - fluxo mássico por unidade de área de biofilme ( $M L^{-2} T^{-1}$ )

$r_{loss}$  – taxa relativa à perda de biomassa ( $M L^{-3} T^{-1}$ )

$r_S$  – taxa de reacção do substrato ( $M L^{-3} T^{-1}$ )

$r_X$  – taxa de reacção específica da espécie microbiológica ( $M L^{-3} T^{-1}$ )  
 $r_X$  - fluxo mássico por unidade de volume de biofilme ( $M L^{-3} T^{-1}$ )  
 $S$  – concentração do substrato ( $M L^{-3}$ )  
 $S_0$  - concentração da solução de alimentação ( $M L^{-3}$ )  
 $S_1$  - concentração do substrato à saída do reactor ( $M L^{-3}$ )  
 $S^*$  - concentração do efluente na interface líquido / biofilme ( $M L^{-3}$ )  
 $S_f$  – concentração de substrato no biofilme ( $M L^{-3}$ )  
 $S_{min}$  - concentração abaixo da qual os microrganismos não conseguem utilizar substrato ( $M L^{-3}$ )  
 $S_{N^*}$  - concentração de azoto ( $M L^{-3}$ )  
 $S_{DO^*}$  - concentração de oxigénio ( $M L^{-3}$ )  
SEM - microscopia electrónica de varrimento  
SST – concentração de sólidos suspensos totais ( $M L^{-3}$ )  
SSV - concentração de sólidos suspensos voláteis ( $M L^{-3}$ )  
 $t_c$  – tempo de consolidação (T)  
TEM - microscopia electrónica de transmissão  
 $U_c$  - razão de consolidação  
 $u_F$  - velocidade com que a biomassa se desprende do meio de suporte ( $L T^{-1}$ )  
 $u_L$  - velocidade na superfície do biofilme ( $L T^{-1}$ )  
UAP - produtos associados à utilização de substrato  
UMCCA – modelo multi-componente e unificado  
 $v_O$  - taxa de consumo de oxigénio ( $M L^{-3} T^{-1}$ )  
 $V_{max,N}$  - taxa máxima específica de consumo de azoto ( $M L^{-3} T^{-1}$ )  
 $v_N$  - taxa de consumo de azoto ( $M L^{-3} T^{-1}$ )  
 $X_a$  - biomassa activa ( $M L^{-3}$ )  
 $X_f$  – densidade celular ( $M L^{-3}$ )  
 $X_{res}$  - biomassa inerte ( $M L^{-3}$ )  
 $Y$  – taxa de conversão biomassa / substrato eliminado (rendimento) (-)  
 $Y_O$  - rendimento de crescimento celular devido ao oxigénio (receptor de electrões) (-)  
 $Y_N$  - rendimento de crescimento celular devido ao azoto (dador de electrões) (-)  
 $Z$  – distância perpendicular ao meio de suporte (L)  
 $\mu$  – taxa específica de crescimento dos microrganismos ( $T^{-1}$ )  
 $\mu_{máx}$  – taxa específica máxima de crescimento dos microrganismos ( $T^{-1}$ )  
 $\Phi$  - Módulo de Thiele (-)  
 $\delta$  - espessura do biofilme (L)



## ÍNDICE

Declaração do Autor .....	i
Agradecimentos .....	iii
Abstract .....	v
Resumo .....	vii
Símbolos e Abreviaturas .....	ix
1. Introdução .....	1
1.1. Aspectos gerais do tratamento de águas residuais .....	1
1.2. Evolução dos sistemas de tratamento de águas residuais .....	1
1.3. Biofilmes... ..	6
1.3.1 Introdução .....	6
1.3.2. Estrutura dos biofilmes.....	7
1.3.3. Métodos de análise de biofilmes.....	9
1.3.4. Modelação de biofilmes.....	11
1.3.5. Evolução da modelação de biofilmes.....	13
1.3.6. Desenvolvimento recente da modelação de biofilmes.....	24
1.3.7. Cinética de reacção biológica .....	34
2. Objectivos. ....	37
3. Plano experimental .....	39
3.1. Descrição geral .....	39
4. Materiais e Métodos .....	41
4.1. Materiais.....	41
4.1.1. Substrato.....	41
4.1.2. Dispositivos experimentais.....	41
4.1.2.1. Para a obtenção de biofilmes de idade constante .....	41
4.1.2.2. Para medição da espessura do biofilme .....	43
4.1.2.3. Para medição da capacidade eléctrica .....	44
4.1.2.4. Para verificação de eventuais processos de adsorção ao meio de suporte . ....	45
4.2. Métodos.....	45
4.2.1. Carbono orgânico total (DOC).....	46
4.2.2. Carência química de oxigénio (CQO) .....	46
4.2.3. Sólidos suspensos totais (SST), Sólidos suspensos voláteis (SSV) .....	46
4.2.4. pH.....	47
4.2.5. Oxigénio dissolvido .....	47
4.2.6. Capacidade eléctrica.....	47
4.2.7. Microscopia electrónica.....	48

4.3. Modo operatório .....	49
5. Resultados .....	55
5.1. Introdução .....	55
5.2. Resultados da Fase 0 .....	56
5.3. Resultados da Fase 1 .....	60
5.4. Resultados da Fase 2 .....	64
5.5. Resultados da Fase 3 .....	71
6. Discussão.....	99
7. Conclusões e perspectivas de trabalho futuro .....	105
8. Referências.....	107
Anexos.....	119
Anexo 1.....	120
Anexo 2.....	123
Anexo 3.....	132

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Etapas de formação de um biofilme .....	7
Figura 2 – Diferentes formas registadas através de A – AFM; B - CLSM; C -SEM; D - TEM .....	10
Figura 3 – Evolução conceptual da modelação de biofilmes. (A) – Biofilme com estrutura homogénea; (B) Biofilme multinutriente e multiespécie; (C) Biofilme heterogéneo composto por colónias de biomassa separadas por canais .....	13
Figura 4 – Instalação piloto .....	42
Figura 5 – Aspectos da Instalação Piloto (A – Vista geral; B – Sistema de alimentação; C – Dispositivo para medição da espessura de biofilme; D – Detalhe dos reactores de discos biológicos).....	43
Figura 6 – Micrómetro utilizado para medição da espessura de biofilme .....	43
Figura 7 – Dispositivo experimental para medição da capacidade eléctrica .....	44
Figura 8 – Adaptação da instalação para ensaios de verificação de adsorção de substrato ao meio de suporte .....	45
Figura 9 – Esquema do dispositivo construído para medição da capacidade eléctrica .....	48
Figura 10 –Medição e Registo da capacidade eléctrica e da espessura do biofilme. (A – Micrómetro; B – Aparelho medidor e registador da capacidade eléctrica) .....	48
Figura 11 –Exemplificação do modo operativo para obtenção de biofilmes com idades compreendidas entre 0,5 e 1 dia.....	52
Figura 12 –Exemplificação do modo operativo para obtenção de biofilmes com idades compreendidas entre 3 e 4 dias.....	53
Figura 13 –Exemplificação do modo operativo para obtenção de biofilmes com idades compreendidas entre 5 e 6 dias.....	53
Figura 14 –Exemplo da evolução da concentração de substrato num reactor.....	55
Figura 15 –Ensaio Contínuo com $S_0=500\text{mgO}_2/\text{l}-\text{CQO}$ . Valores registados em CQO .....	57
Figura 16 –Ensaio Contínuo com $S_0=1000\text{mgO}_2/\text{l}-\text{CQO}$ . Valores registados em CQO .....	57
Figura 17 –Ensaio continuo com $S_0=500\text{mgO}_2/\text{l}-\text{CQO}$ . Valores registados em DOC .....	57
Figura 18 –Ensaio continuo com $S_0=1000\text{mgO}_2/\text{l}-\text{CQO}$ . Valores registados em DOC .....	57
Figura 19 –Valores médios de CT no reactor .....	59
Figura 20 - Valores médios de CI no reactor .....	59
Figura 21 –Evolução da capacidade eléctrica do biofilme a diferentes frequências .....	60
Figura 22 –Variação da capacidade eléctrica com a espessura do biofilme .....	61
Figura 23 –Correlação entre a espessura e a capacidade eléctrica do biofilme .....	62



Figura 62 –Valores de SST registados e médios diários para Id 2 a 3 dia. Fase 3.....	74
Figura 63 –Valores de SST registados e médios diários para Id 3 a 4 dia. Fase 3.....	74
Figura 64 –Valores de SST registados e médios diários para Id 4 a 5 dia. Fase 3.....	74
Figura 65 –Valores de SST registados e médios diários para Id 5 a 6 dia. Fase 3.....	74
Figura 66 –Valores de SSV registados e médios diários para Id 0,5 a 1 dia. Fase 3.....	75
Figura 67 –Valores de SSV registados e médios diários para Id 1 a 2 dia. Fase 3.....	75
Figura 68 –Valores de SSV registados e médios diários para Id 2 a 3 dia. Fase 3.....	75
Figura 69 –Valores de SSV registados e médios diários para Id 3 a 4 dia. Fase 3.....	75
Figura 70 –Valores de SSV registados e médios diários para Id 2 a 3 dia. Fase 3.....	75
Figura 71 –Valores de SSV registados e médios diários para Id 3 a 4 dia. Fase 3.....	75
Figura 72 –Aspecto do biofilme com idade entre 0,5 e 1 dia com $S_0 = 500 \text{ mgO}_2/\text{l}$ – CQO e $S_0 = 1000 \text{ mgO}_2/\text{l}$ – CQO, respectivamente.....	76
Figura 73 –Aspecto do biofilme com idade entre 1 e 2 dias com $S_0 = 500 \text{ mgO}_2/\text{l}$ – CQO e $S_0 = 1000 \text{ mgO}_2/\text{l}$ – CQO, respectivamente.....	76
Figura 74 –Aspecto do biofilme com idade entre 2 e 3 dias com $S_0 = 500 \text{ mgO}_2/\text{l}$ – CQO e $S_0 = 1000 \text{ mgO}_2/\text{l}$ – CQO, respectivamente.....	77
Figura 75 –Aspecto do biofilme com idade entre 3 e 4 dias com $S_0 = 500 \text{ mgO}_2/\text{l}$ – CQO e $S_0 = 1000 \text{ mgO}_2/\text{l}$ – CQO, respectivamente.....	77
Figura 76 –Aspecto do biofilme com idade entre 4 e 5 dias com $S_0 = 500 \text{ mgO}_2/\text{l}$ – CQO e $S_0 = 1000 \text{ mgO}_2/\text{l}$ – CQO, respectivamente.....	78
Figura 77 –Aspecto do biofilme com idade entre 5 e 6 dias com uma alimentação de $500 \text{ mgO}_2/\text{l}$ – CQO e de $1000 \text{ mgO}_2/\text{l}$ – CQO, respectivamente. ....	78
Figura 78 –Valores médios diários (DOC) para as idades de biofilme analisadas – Fase 2.....	79
Figura 79 –Valores médios diários (DOC) para as idades de biofilme analisadas – Fase 3.....	79
Figura 80 –Valores médios diários (CQO) para as idades de biofilme analisadas – Fase 2.....	79
Figura 81 –Valores médios diários (CQO) para as idades de biofilme analisadas – Fase 3.....	79
Figura 82 –Valores médios diários (SST) para as idades de biofilme analisadas – Fase 2.....	80
Figura 83 –Valores médios diários (SST) para as idades de biofilme analisadas – Fase 3.....	80
Figura 84 –Valores médios diários (SSV) para as idades de biofilme analisadas – Fase 2.....	81

Figura 85 –Valores médios diários (SSV) para as idades de biofilme analisadas – Fase 3.....	81
Figura 86 –Fluxo mássico, por unidade de área, ao longo do tempo de ensaio, para as idades de biofilme analisadas. - Fluxos mássicos calculados através de valores registados em DOC – Fase 2 .....	82
Figura 87 –Fluxo mássico, por unidade de área, ao longo do tempo de ensaio, para as idades de biofilme analisadas. – Fluxos mássicos calculados através de valores expressos em CQO – Fase 2.....	83
Figura 88 –Fluxo mássico, por unidade de volume de biofilme, ao longo do tempo de ensaio, para as idades de biofilme analisadas. – Fluxos mássicos calculados através de valores expressos em DOC (g C/m <sup>3</sup> .h) – Fase 2.....	83
Figura 89 –Fluxo mássico, por unidade de volume de biofilme, ao longo do tempo de ensaio, para as idades de biofilme analisadas. – Fluxos mássicos calculados através de valores expressos em CQO (g O <sub>2</sub> /m <sup>3</sup> .h) – Fase 2 .....	84
Figura 90 –Fluxo mássico, por unidade de área, ao longo do tempo de ensaio, para as idades de biofilme analisadas. - Fluxos mássicos calculados através de valores expressos em DOC – Fase 3.....	85
Figura 91 –Fluxo mássico, por unidade de área, ao longo do tempo de ensaio, para as idades de biofilme analisadas. – Fluxos mássicos calculados através de valores expressos em CQO - Fase 3 .....	85
Figura 92 –Fluxo mássico, por unidade de volume de biofilme, ao longo do tempo de ensaio, para as idades de biofilme analisadas. – Fluxos mássicos calculados através de valores expressos em DOC (g C/m <sup>3</sup> .h) – Fase 3.....	86
Figura 93 –Fluxo mássico, por unidade de volume de biofilme, ao longo do tempo de ensaio, para as idades de biofilme analisadas. – Fluxos mássicos calculados através de valores expressos em CQO (gO <sub>2</sub> /m <sup>3</sup> .h) – Fase 3.....	86
Figura 94 - Fluxo mássico por unidade de área (DOC) para as idades de biofilme estudadas e para o 1º dia de ensaio – Fase 2 .....	87
Figura 95 - Fluxo mássico por unidade de área (DOC) para as idades de biofilme estudadas e para o 2º dia de ensaio – Fase 2 .....	87
Figura 96 - Fluxo mássico por unidade de área (DOC) para as idades de biofilme estudadas e para o 3º dia de ensaio – Fase 2 .....	87
Figura 97 - Fluxo mássico por unidade de área (DOC) para as idades de biofilme estudadas e para o 4º dia de ensaio – Fase 2 .....	87
Figura 98 - Fluxo mássico por unidade de área (DOC) para as idades de biofilme estudadas e para o 5º dia de ensaio – Fase 2 .....	88
Figura 99 - Fluxo mássico por unidade de área (DOC) para as idades de biofilme estudadas e para o 6º dia de ensaio – Fase 2.....	88

Figura 100 - Fluxo mássico por unidade de área (DOC) para as idades de biofilme estudadas e para o 7º dia de ensaio – Fase 2 .....	88
Figura 101 - Fluxo mássico por unidade de área (DOC) para as idades de biofilme estudadas e para o 8º dia de ensaio – Fase 2 .....	88
Figura 102 - Fluxo mássico por unidade de área (DOC) para as idades de biofilme estudadas e para o 9º dia de ensaio – Fase 2 .....	88
Figura 103 - Fluxo mássico por unidade de área (DOC) para as idades de biofilme estudadas e para o 10º dia de ensaio – Fase 2 .....	88
Figura 104 - Fluxo mássico por unidade de área (CQO) para as idades de biofilme estudadas e para o 1º dia de ensaio – Fase 2 .....	89
Figura 105 - Fluxo mássico por unidade de área (CQO) para as idades de biofilme estudadas e para o 2º dia de ensaio – Fase 2 .....	89
Figura 106 - Fluxo mássico por unidade de área (CQO) para as idades de biofilme estudadas e para o 3º dia de ensaio – Fase 2 .....	89
Figura 107 - Fluxo mássico por unidade de área (CQO) para as idades de biofilme estudadas e para o 4º dia de ensaio – Fase 2 .....	89
Figura 108 - Fluxo mássico por unidade de área (CQO) para as idades de biofilme estudadas e para o 5º dia de ensaio – Fase 2 .....	90
Figura 109 - Fluxo mássico por unidade de área (CQO) para as idades de biofilme estudadas e para o 6º dia de ensaio – Fase 2 .....	90
Figura 110 - Fluxo mássico por unidade de área (CQO) para as idades de biofilme estudadas e para o 7º dia de ensaio – Fase 2 .....	90
Figura 111 - Fluxo mássico por unidade de área (CQO) para as idades de biofilme estudadas e para o 8º dia de ensaio – Fase 2 .....	90
Figura 112 - Fluxo mássico por unidade de área (CQO) para as idades de biofilme estudadas e para o 9º dia de ensaio – Fase 2 .....	90
Figura 113 - Fluxo mássico por unidade de área (CQO) para as idades de biofilme estudadas e para o 10º dia de ensaio – Fase 2 .....	90
Figura 114 - Fluxo mássico por unidade de área (DOC) para as idades de biofilme estudadas e para o 1º dia de ensaio – Fase 3 .....	91
Figura 115 - Fluxo mássico por unidade de área (DOC) para as idades de biofilme estudadas e para o 2º dia de ensaio – Fase 3 .....	91
Figura 116 - Fluxo mássico por unidade de área (DOC) para as idades de biofilme estudadas e para o 3º dia de ensaio – Fase 3 .....	91
Figura 117 - Fluxo mássico por unidade de área (DOC) para as idades de biofilme estudadas e para o 4º dia de ensaio – Fase 3 .....	91
Figura 118 - Fluxo mássico por unidade de área (DOC) para as idades de biofilme estudadas e para o 5º dia de ensaio – Fase 3 .....	92

Figura 119 - Fluxo mássico por unidade de área (DOC) para as idades de biofilme estudadas e para o 6º dia de ensaio – Fase 3 .....	92
Figura 120 - Fluxo mássico por unidade de área (DOC) para as idades de biofilme estudadas e para o 7º dia de ensaio – Fase 3 .....	92
Figura 121 - Fluxo mássico por unidade de área (DOC) para as idades de biofilme estudadas e para o 8º dia de ensaio – Fase 3 .....	92
Figura 122 - Fluxo mássico por unidade de área (DOC) para as idades de biofilme estudadas e para o 9º dia de ensaio – Fase 3 .....	92
Figura 123 - Fluxo mássico por unidade de área (DOC) para as idades de biofilme estudadas e para o 10º dia de ensaio – Fase 3 .....	92
Figura 124 - Fluxo mássico por unidade de área (CQO) para as idades de biofilme estudadas e para o 1º dia de ensaio – Fase 3 .....	93
Figura 125 - Fluxo mássico por unidade de área (CQO) para as idades de biofilme estudadas e para o 2º dia de ensaio – Fase 3 .....	93
Figura 126 - Fluxo mássico por unidade de área (CQO) para as idades de biofilme estudadas e para o 3º dia de ensaio – Fase 3 .....	93
Figura 127 - Fluxo mássico por unidade de área (CQO) para as idades de biofilme estudadas e para o 4º dia de ensaio – Fase 3 .....	93
Figura 128 - Fluxo mássico por unidade de área (CQO) para as idades de biofilme estudadas e para o 5º dia de ensaio – Fase 3 .....	94
Figura 129 - Fluxo mássico por unidade de área (CQO) para as idades de biofilme estudadas e para o 6º dia de ensaio – Fase 3 .....	94
Figura 130 - Fluxo mássico por unidade de área (CQO) para as idades de biofilme estudadas e para o 7º dia de ensaio – Fase 3 .....	94
Figura 131 - Fluxo mássico por unidade de área (CQO) para as idades de biofilme estudadas e para o 8º dia de ensaio – Fase 3 .....	94
Figura 132 - Fluxo mássico por unidade de área (CQO) para as idades de biofilme estudadas e para o 7º dia de ensaio – Fase 3 .....	94
Figura 133 - Fluxo mássico por unidade de área (CQO) para as idades de biofilme estudadas e para o 8º dia de ensaio – Fase 3 .....	94
Figura 134 – Evolução da espessura do biofilme ao longo do tempo de ensaio, Fases 2 e 3 .....	96
Figura 135 – Módulo de Thiele obtido para as idades de biofilme estudadas, para a Fase 2 – DOC .....	97
Figura 136 – Módulo de Thiele obtido para as idades de biofilme estudadas, para a Fase 2 – CQO .....	97
Figura 137 – Módulo de Thiele obtido para as idades de biofilme estudadas, para a Fase 3 – DOC .....	97



Figura 138 – Módulo de Thiele obtido para as idades de biofilme estudadas, para a Fase 3 – CQO .....	97
Figura 139 – Análise do comportamento do biofilme, $S_0 = 500 \text{ mgO}_2/\text{l}$ .....	102
Figura 140 – Análise do comportamento do biofilme, $S_0 = 1000 \text{ mgO}_2/\text{l}$ .....	102



## ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 – Resumo dos principais modelos e respectivas características .....	31
Quadro 2 – Resumo do Plano experimental .....	39
Quadro 3 – Plano experimental (Fase 1) .....	39
Quadro 4 – Plano experimental (Fases 2 e 3) .....	40
Quadro 5 – Principais características do substrato .....	41
Quadro 6 – Principais condições das fases experimentais .....	55
Quadro 7 – Notação utilizada para nos diferentes ensaios.....	55
Quadro 8 – Ensaio Contínuo – $S_0 = 500\text{mgO}_2/\text{l}$ – CQO .....	56
Quadro 9 – Ensaio Contínuo – $S_0 = 1000\text{mgO}_2/\text{l}$ – CQO .....	56
Quadro 10 – Resultados do ensaio de verificação da existência de adsorção ao meio de suporte – Concentração da solução de alimentação de $500\text{mgO}_2/\text{l}$ – CQO .....	58
Quadro 11 – Resultados do ensaio de verificação da existência de adsorção ao meio de suporte – Concentração da solução de alimentação de $1000\text{mg O}_2/\text{l}$ – CQO .....	58
Quadro 12 – Espessura do biofilme e capacidade eléctrica a diferentes frequências.....	60
Quadro 13 – Fase 2 – Id 0,5 a 1 dia.....	64
Quadro 14 – Fase 2 – Id 1 a 2 dia.....	64
Quadro 15 – Fase 2 – Id 2 a 3 dia.....	64
Quadro 16 – Fase 2 – Id 3 a 4 dia.....	65
Quadro 17 – Fase 2 – Id 4 a 5 dia.....	65
Quadro 18 – Fase 2 – Id 5 a 6 dia.....	65
Quadro 19 – Fase 3 – Id 0,5 a 1 dia.....	70
Quadro 20 – Fase 3 – Id 1 a 2 dia.....	70
Quadro 21 – Fase 3 – Id 2 a 3 dia.....	70
Quadro 22 – Fase 3 – Id 3 a 4 dia.....	71
Quadro 23 – Fase 3 – Id 4 a 5 dia.....	71
Quadro 24 – Fase 3 – Id 5 a 6 dia.....	71
Quadro 25 – Valores de $S^*$ utilizados para cálculo do Módulo de Thiele .....	95
Quadro 26 – Valores dos fluxos mássicos por unidade de área (rA), utilizados para cálculo do Módulo de Thiele.....	96
Quadro 27 – Análise do comportamento do biofilme, $S_0 = 500 \text{ mgO}_2/\text{l}$ .....	101
Quadro 28 – Análise do comportamento do biofilme, $S_0 = 1000 \text{ mgO}_2/\text{l}$ .....	101



## **1. Introdução**

### **1.1. Aspectos gerais do tratamento de águas residuais**

A preservação do Ambiente, nos seus múltiplos aspectos, tornou-se uma questão incontornável para a sociedade moderna, face às ameaças de destruição que impendem sobre o planeta e, consequentemente, sobre o Homem.

Todas as comunidades produzem resíduos, sólidos, líquidos e gasosos. Os resíduos líquidos (águas residuais) são constituídos por efluentes provenientes de habitações, instituições e estabelecimentos comerciais e industriais e, também, por infiltrações de água nas redes de drenagem. Quando se verificam acumulações de águas residuais, conducentes a condições de septicidade, ocorre naturalmente a decomposição da matéria orgânica que provoca efeitos indesejáveis, nomeadamente a produção de maus cheiros. Por outro lado, a descarga de águas residuais não tratadas em meios aquáticos implica, pelos nutrientes que contém, o desenvolvimento da fauna e flora daqueles meios, com os inerentes inconvenientes. É, portanto, necessária e imprescindível a recolha e tratamento das águas residuais de modo a proteger o ambiente e a saúde pública.

Embora só a partir do século XIX se tenha atribuído ao tratamento de águas residuais a importância que lhe é devida, no âmbito do ciclo urbano da água, foram diversas as razões pelas quais se materializou ao longo do tempo.

### **1.2. Evolução dos sistemas de tratamento de águas residuais**

Até ao século V d.C., o problema das águas residuais foi encarado numa perspectiva dos inconvenientes estéticos. Basicamente, a solução passava pela recolha das águas residuais e, nalguns casos, na sua aplicação em campos agrícolas (Burks e Minnis, 1994).

Com a queda do Império Romano verificou-se um retrocesso, voltando a ser aceitável a rejeição das águas residuais para a rua, o que esteve na origem do eclodir de epidemias, como foi o caso da cólera. No entanto, e apesar de todos os constrangimentos causados por esta prática, só quando (meados do século XIX) se conseguiu relacionar a transmissão de epidemias pela água é que o tratamento de águas residuais ganhou maior atenção. Nesse tempo, os aspectos estéticos deram lugar a aspectos relacionados com a saúde pública e a tecnologia aplicada para o tratamento de águas residuais teve uma importância irrefutável na promoção do controlo de doenças e na protecção do ambiente.

Assim, na segunda metade do século XIX, começaram a surgir os primeiros sistemas de tratamento de águas residuais, sendo neste período, e no início do século XX, que se registaram os maiores desenvolvimentos tecnológicos a este nível.

Em 1870, Alexander Mueller demonstrou que uma água residual podia ser tratada por microrganismos através de um sistema de filtros intermitentes de areia (Peters e Alleman, 1983). No entanto, só posteriormente é que este sistema foi reconhecido como um processo biológico de tratamento de águas residuais e não como um sistema físico de separação de materiais.

Segundo Kiersted (1894), o valor prático dos sistemas de tratamento através de filtração intermitente, utilizado na purificação de um esgoto doméstico, foi pela primeira vez reconhecido a Sir Edward Frankland, em 1870. Nesses estudos, foi utilizado um meio filtrante composto por vários materiais, nomeadamente cascalho e solo, e feita variar a dose de água residual aplicada aos filtros, conseguindo deste modo controlar a eficiência do tratamento (Peters e Alleman, 1983). A necessidade destes filtros funcionarem em regime intermitente, implicou a introdução de um novo conceito extremamente importante no tratamento biológico de águas residuais, o do tempo de retenção, ou tempo para arejamento entre aplicações de água residual no filtro. À semelhança do que tinha acontecido com os filtros intermitentes de areia e com os sistemas de Alexander Mueller, também estes sistemas foram considerados como físico-químicos e não de natureza biológica, como mais tarde veio a ser reconhecido (Peters e Alleman, 1983).

A par com estes estudos sobre filtração intermitente, foram realizados outros semelhantes, em diferentes países, nomeadamente na Alemanha e em Inglaterra (Seeger, 1999 e Brown, 2005).

Em Inglaterra, na sequência do aparecimento da epidemia de febre tifóide e de cólera e quando se relacionaram estas epidemias com a contaminação dos reservatórios de água com as águas residuais não tratadas, foi criada a *Royal Commission of England on Treatment and Disposal of Sewage* à qual foi atribuída a responsabilidade da investigação, controlo e estudo do tratamento de águas residuais.

Nos Estados Unidos da América o percurso foi idêntico, na medida em que também se criaram equipas que se ocuparam de estudar formas de tratar efluentes domésticos, sendo a *Massachusetts State Board of Health* uma das mais conhecidas (*Commission on Life Sciences*, 1977) e onde mais tarde se vieram a desenvolver os estudos designados por “Estudos da Estação Experimental de Lawrence”.

Da equipa da Estação Experimental de Lawrence, destaca-se um conjunto de investigadores, entre os quais, Hiram F. Mills, Sedwick, Drown e Allen Hazen, o qual realizou diversos ensaios de filtração utilizando um regime intermitente de alimentação de água residual, que lhes permitiu constatar a existência de uma relação entre a actividade microbiológica e a degradação de uma água residual (Peters e Alleman, 1983).

A actividade destas equipas levou à produção de múltiplos relatórios onde se pode constatar não só a evolução dos sistemas de tratamento de águas residuais (substituição das fossas sépticas por sistemas de filtração intermitente), bem como a protecção dos sistemas de distribuição e armazenamento de água, tendo estes desenvolvimentos como objectivo a protecção da saúde pública (*Royal Commission on Sewage Disposal*, 1908, Johnston, 1913 e Johnston, 1915).

Quase uma década depois de Alexander Mueller ter apresentado os resultados dos seus estudos, vários foram os investigadores que exploraram o conceito de tratamento biológico de águas residuais. Schloesing and Muntz, Warrington e Winogradsky apresentaram resultados que demonstraram a capacidade de nitrificação do solo, tendo inclusivamente sido identificada a bactéria Nitrosomonas (Peters e Alleman, 1983).

De acordo com Melosi (2000), no século XIX os engenheiros sanitaristas ingleses foram líderes no estabelecimento de normas e desenvolvimento de novos tratamentos para água e para águas residuais podendo distinguir-se o trabalho de Sir Edwin Chadwick, membro da *Royal Commission on Sewage Disposal*.

Ainda no final do século XIX, destaca-se o estudo apresentado por F. Wallis Stoddart (Stoddart, 1893), cuja inovação se prendeu com o modo de alimentação dos reactores, que embora iniciado com um pequeno fluxo, “gota a gota”, constituía já um exemplo de funcionamento em contínuo. Da evolução e aperfeiçoamento destes estudos surgiram os actuais sistemas de tratamento por leitos percoladores.

Outro estudo que se destacou foi o de W. J. Dibdin (1907), intitulado “*The Disposition and Analysis of sewage Debris in Contact Beds*”, onde foi introduzido o conceito de leitos de contacto, também com diferentes meios de enchimento mas com a alimentação do efluente ainda em regime fechado.

Nos anos seguintes foram estudadas intensivamente as formas e regimes de alimentação de águas residuais a estes tipos de sistemas de tratamento (leitos percoladores e leitos de contacto).

Waring e Lowcock, em 1892, desenvolveram um sistema de alimentação de águas residuais para filtros de regime intermitente com distribuição uniforme. Este sistema consistiu na

instalação de uma camada superficial de gravilha para promover a distribuição do efluente (Peters e Alleman, 1983). No estudo apresentado por Lowcock (1894) é ainda apresentada a relação entre a quantidade de amónia inicial e a eficiência de remoção de azoto final, como uma medida alternativa para medir a eficiência de tratamento do efluente. Neste estudo é ainda constatada a evidente necessidade do uso de arejamento, bem como de outros aspectos menos importantes, como a influência da presença de luz na eficiência de tratamento. Mais tarde, na sequência destes estudos, Waring, veio a patentear um sistema de tratamento de leitos percoladores que incorporavam um sistema de arejamento forçado.

Outra importante inovação foi desenvolvida por Whittaker e Bryant com a introdução do distribuidor rotativo, “sprinkler”, intermitente. Este sistema para além de introduzir um pulso e um fluxo de alimentação intermitente, também permitia aquecer o afluente. No entanto, este sistema utilizava tubagens perfuradas que rapidamente colmatavam (Peters e Alleman, 1983).

Devido às investigações de Hazen, Stoddart, Corbett e Dibdin, os anos que se seguiram foram, principalmente, dedicados à aplicação prática destes sistemas e ao seu aperfeiçoamento. Foram propostos vários modelos, tendo sido conseguidos diversos aperfeiçoamentos (Peters e Alleman, 1983).

Na Alemanha, apesar da evolução dos sistemas de tratamento de águas residuais ter sido mais lenta do que nos Estados Unidos da América e do que em Inglaterra, e de, até ao início do século XX apenas se terem construído sistemas de tratamento meramente físicos, em 1906, Karl Imhoff, patenteou um órgão que consistia num tanque cilíndrico de decantação, na parte superior, e um tanque para digestão de lamas, na parte inferior, conhecido por tanque Imhoff. Esta configuração permitia a realização de duas etapas de tratamento no mesmo órgão, introduzindo a digestão anaeróbia de lamas, tendo sido o tratamento mais comum na Alemanha até à segunda guerra mundial (Seeger, 1999).

A. Prescott Folwell (1916), descreveu um avanço relativo a um aspecto complementar do tratamento de águas residuais, nomeadamente relata a crescente preocupação com odores, traduzida pela incorporação de mecanismos, embora rudimentares, de desodorização.

É interessante verificar que, até ao início do século XX, os sistemas de tratamento biológico desenvolvidos se socorriam, essencialmente, de sistemas de biomassa fixa.

Em 1914, William Lockett e Edward Arden (1915) começaram o histórico estudo dos sistemas de tratamento com biomassa em suspensão – Lamas Activadas. Estes primeiros estudos consistiram em sistemas intermitentes de alimentação de água residual (“batch”),



que se distinguiam dos anteriores apenas pela utilização de biomassa em suspensão, em vez de biomassa fixa.

Apesar da fantástica inovação verificada, só mais tarde este tipo de sistema de tratamento mereceu a atenção que lhe era devida.

Os sistemas de lamas activadas, ainda em fase de aperfeiçoamento, acarretavam custos elevados de investimento e manutenção exigente, o que tornou a sua utilização quase proibitiva (Seeger, 1999).

Em Leipzig, em 1927, foi registada uma inovação relativa à digestão de lamas que passava a ser efectuada em órgão dedicado, aquecido, o que conduziu a eficiências muito superiores às anteriormente registadas. Com este avanço tecnológico começou a surgir o interesse pelo aproveitamento de biogás, tendo sido registado em 1924, em Essen Recklinghausen (Alemanha), a sua primeira utilização como combustível (Seeger, 1999).

Até 1950, verificou-se um abandono dos sistemas de filtração intermitente e a intensificação do desenvolvimento de sistema de leitos percoladores, nomeadamente o aumento da sua capacidade hidráulica, o aperfeiçoamento dos sistemas rotativos de distribuição de água residual e a utilização de novos meios de enchimento (nomeadamente plásticos) (Peters e Alleman, 1983).

Apesar de haver registos da utilização de discos biológicos, como sistemas de tratamento de águas residuais, que datam de 1928, só em 1958, com a generalização da utilização do plástico é que a sua aplicação se expandiu na Alemanha (Dutta, 2007). Em 1968, estes sistemas foram exportados para os E.U.A, sob a marca de *Bio-Disc* (Smith e Bandy, 1980).

Apesar das vantagens apresentadas por este tipo de sistemas de tratamento, quando comparados com os sistemas de lamas activadas, ao tempo, não conseguiam ser competitivos, devido ao elevado custo de investimento (Dutta, 2007).

A partir da década de 70, com a crescente preocupação da poluição dos meios receptores, os sistemas de tratamento tiveram de se adaptar às novas exigências de descarga, tendo-se tornado ainda mais eficientes, passando a conseguir remover outros compostos para além dos carbonatados, nomeadamente azoto, fósforo, etc., de que são exemplos os estudos desenvolvidos por Barnand, na África do Sul (Cooper 2000).

Os avanços tecnológicos mais significativos registados na década de 90 estão directamente ligados ao desenvolvimento de reactores com membranas que, apesar de terem surgido ainda nos anos 60, a sua generalização só foi possível com o reactor biológico de

membranas desenvolvido pela *Kubota* (Japão) – (MBRs), devido ao seu relativo baixo custo de investimento e manutenção (Cooper 2000).

O tratamento de águas residuais com biomassa fixa teve um papel inquestionável na história da evolução dos sistemas de tratamento, na medida em que permitiu materializar de forma consistente a despoluição de águas residuais. A biomassa fixa dominou a tecnologia de tratamento de águas residuais durante várias décadas, começando com leitos percoladores, passando por filtros intermitentes e por discos biológicos. Embora mais recentemente tal relevo tenha sido assumido por sistemas de biomassa em suspensão, é inquestionável o interesse que as aplicações de sistemas de biomassa fixa voltaram a suscitar, nomeadamente com os biofiltros, ou em combinações com biomassa em suspensão, nos designados sistemas mistos.

### **1.3. Biofilmes**

#### **1.3.1 – Introdução**

Um biofilme é um conjunto de microrganismos, principalmente bactérias, que num ambiente aquoso aderem a uma dada superfície. Na verdade, pode-se formar um biofilme em qualquer superfície que esteja exposta ao contacto com bactérias e com um meio líquido, razão porque o crescimento de biofilmes mereceu o interesse de diversas áreas (medicina, limnologia, bio-corrosão, bio-conversão etc.), tendo permitido descrições muito desenvolvidas de conversão de substratos solubilizados pelos biofilmes, bem como do conhecimento da distribuição dos microrganismos nos biofilmes (Characklis e Marshall, 1989).

Um biofilme pode ser constituído por uma única espécie de bactérias ou, na maior parte de casos, por várias espécies, incluindo, fungos, protozoários e algas. Uma vez formado, no biofilme desencadeia-se uma série de reacções microbiológicas, que podem ser benéficas ou não (tendo em consideração aspectos relacionados com a saúde humana), dependendo das condições ambientais envolventes.

Na Figura 1, mostram-se, esquematicamente, as etapas de formação de um biofilme.

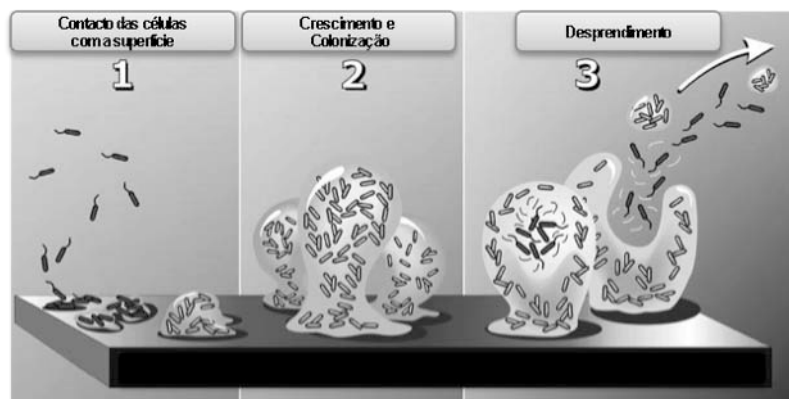


Figura 1 - Etapas de formação de um biofilme (Adaptado de *Center for Biofilm Engineering*)

### 1.3.2. Estrutura dos biofilmes

Ao longo do tempo, foram admitidas várias interpretações para o tipo de estrutura dos biofilmes, desde configurações em monocamada a estruturas extremamente complexas, densas, espessas e gelatinosas. Aliás, qualquer organização microbológica foi considerada um biofilme (Costerton *et.al.*, 1981).

Até à década de 80, considerou-se que os biofilmes possuíam uma estrutura plana e com uma espessura relativamente constante (Costerton *et.al.*, 1981). No entanto, e com o avanço das técnicas analíticas, foram surgindo dúvidas em relação àquele tipo de estrutura e também quanto à homogeneidade dos biofilmes.

Apesar de todos os constrangimentos de observação, de um modo geral concluiu-se que a estrutura de um biofilme é influenciada por parâmetros relacionados com o tipo de reator em que se desenvolve e com o tipo de microrganismos presentes, ou com o seu grupo fisiológico. Entre os parâmetros relacionados com o tipo de reator destacam-se as condições hidrodinâmicas e a carga orgânica (substrato) disponível à superfície do biofilme.

A influência do tipo de reactores na estrutura do biofilme tem sido estudada em diferentes áreas (ex. engenharia, medicina, limnologia, microbiologia, bioquímica), não sendo fácil comparar os diferentes trabalhos realizados sobre o assunto, (van Loosdrecht *et al.*, 1995). No entanto, e por essa razão, alguns aspectos continuam a ser mal conhecidos.

Por outro lado, e mesmo utilizando as técnicas mais avançadas para análise da estrutura do biofilme, a sua forma ainda não é consensual em todas as áreas, existindo três correntes distintas de investigação.

Uma das correntes, maioritariamente desenvolvida por investigadores na área da medicina e utilizando a microscopia de transmissão de electrões (TEM), assentou numa teoria tradicional, em que o biofilme tem uma estrutura plana e homogénea (Nyvad e Fejerskov, 1997)

A segunda corrente de investigação foi desenvolvida pela equipa de Keevil e Walker, (1992) que utilizou a microscopia DIC (*Differential Interference Contrast*) aplicada ao crescimento de biofilmes em tubagens de distribuição de água. Nestes estudos foram identificadas colónias de bactérias ligadas entre si através de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) rodeadas de uma fase líquida, na qual existiam também diversos protozoários. Por baixo desta camada, foi ainda identificada uma outra, constituída por um conjunto de células fixadas ao suporte. Este tipo de estrutura foi denominado “modelo de mosaico heterogéneo”.

A terceira corrente foi desenvolvida maioritariamente por microbiologistas que conceberam o “modelo de cogumelo ou tulpas”. As técnicas de análise utilizadas foram o *CLSM* (*confocal laser scanning microscopy*) e marcadores de fluorescência. Como o próprio nome do modelo indica, a estrutura do biofilme tem a forma de um cogumelo. A estrutura é penetrada por canais por onde passa uma fase líquida que transporta oxigénio, nutrientes e subprodutos gerados pelos microrganismos. Porém, a influência da fase líquida que circula no interior dos canais ainda não é totalmente conhecida (de Beer *et al.*, 1994 e Xavier, *et al.*, 2003).

Apesar de as três correntes de investigação referidas utilizarem diferentes técnicas analíticas, a concentração de substrato utilizada em cada uma delas também foi distinta, o que poderá estar na origem da heterogeneidade das respectivas conclusões.

No caso do modelo do mosaico heterogéneo, a concentração de substrato é muito baixa, da ordem dos  $\mu\text{g/l}$  ou de  $1\text{mg/l}$ , enquanto na primeira corrente de investigação a concentração de substrato é bastante superior ( $100\text{g/l}$ ). Nas estruturas de cogumelos foram verificadas concentrações de substrato de valor intermédio relativamente às referidas anteriormente.

Contudo, em qualquer dos casos, os biofilmes são descritos como estruturas muito complexas de elevada heterogeneidade.

### 1.3.3. Métodos de análise de biofilmes

Seguidamente, revêem-se os principais métodos de observação e análise de biofilmes.

Actualmente existe um elevado número de técnicas de microscopia que permitem adquirir um conhecimento muito alargado acerca da formação e estrutura dos biofilmes. No entanto, todas as técnicas desenvolvidas têm problemas de interpretação de imagem, sendo por isso necessário utilizar algumas técnicas adicionais para poder produzir imagens finais com leitura aceitável (Wimpenny *et al.*, 2000).

Basicamente, um biofilme pode ser analisado de três formas: desidratado, parcialmente hidratado e hidratado.

As principais técnicas de microscopia para observação e análise de um biofilme são: **(i)** a Microscopia Óptica Tradicional, que permitiu a identificação de uma grande variedade de bactérias, baseada nas suas características morfológicas (Henrici, 1933 e Hirsch e Pankratz, 1970). Contudo, e devido à grande complexidade da estrutura de um biofilme, esta técnica não permitiu obter um conhecimento mais aprofundado, sendo por isso praticamente abandonada nos estudos que requerem maior detalhe e um maior grau de complexidade; **(ii)** Microscopia Electrónica que se divide em **(iia)** Microscopia Electrónica de Transmissão (TEM) e em **(iib)** Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM). Um dos pré-requisitos da microscopia electrónica consiste na fixação e desidratação da amostra. Relativamente à técnica de Microscopia Electrónica de Transmissão (TEM) esta permite uma análise detalhada das células, nomeadamente a sua morfologia, distribuição e alguns aspectos da sua ultraestrutura. Se combinada com alguns marcadores, permite ainda a identificação de algumas substâncias poliméricas extracelulares (EPS) e, dessa forma, a identificação de algumas bactérias. Uma vez que esta técnica requer um passo de desidratação da amostra, prevalecem dúvidas quanto à identificação de algumas características das células. A informação obtida é baseada na análise de secções cruzadas (Nyvad e Fejerskov, 1997) e, apesar de ter algumas limitações, ainda é muito utilizada para o estudo da estrutura de biofilmes (Costerton, 1985). Relativamente à Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM) é uma técnica que produz uma imagem em 3D, permitindo obter uma informação detalhada em relação à estrutura superficial do biofilme (Richard e Turner, 1984). À semelhança da TEM, requer uma preparação da amostra que envolve uma desidratação e um passo de fixação, o que pode ser vantajoso por permitir analisar as células e a sua distribuição. Por outro lado, se existirem EPS, estas facilmente secarão com o processo de desidratação e, consequentemente, a informação produzida é limitada. Se o microscópio estiver equipado com acessórios que produzam vácuo fraco (baixa pressão), poder-se-ão examinar amostras frescas, mas a informação é meramente informativa, uma vez que o biofilme está associado às EPS e a imagem obtida é muito pouco nítida (Xavier *et al.*, 2003); **(iii)** Microscopia

Atômica (AFM), é também uma técnica muito utilizada porque permite obter imagens de alta resolução da estrutura superficial e atômica do biofilme e das células individualizadas que o constituem (Xavier *et al.*, 2003); **(iv)** Microscopia laser confocal de varrimento (CLSM) é considerada a técnica mais avançada e completa de todas. Apesar do primeiro equipamento de medição ter surgido em 1957, por Marvin Minski (1988), só 30 anos mais tarde surgiu a forma comercializada (Inoue, 1995), aplicado à área da medicina. Em 1993, Lawrence *et al.*, (1991) utilizaram a CLSM para análise de biofilmes. A CLSM veio permitir obter uma informação multidimensional muito aprofundada de amostras de biofilme totalmente hidratadas. A estrutura do biofilme, em forma de cogumelo ou tulpas, bem como toda a dinâmica de fluidos dentro do biofilme foi obtida através desta técnica. Contudo, e devido à complexidade desta técnica e da própria heterogeneidade da estrutura dos biofilmes (Flemming *et al.*, 2000) ainda existe um longo caminho a percorrer, nomeadamente da interação dos microrganismos que constituem o biofilme com o ambiente que os rodeia.

Na Figura 2 mostram-se exemplos das diferentes formas registadas através das técnicas analíticas anteriormente indicadas.

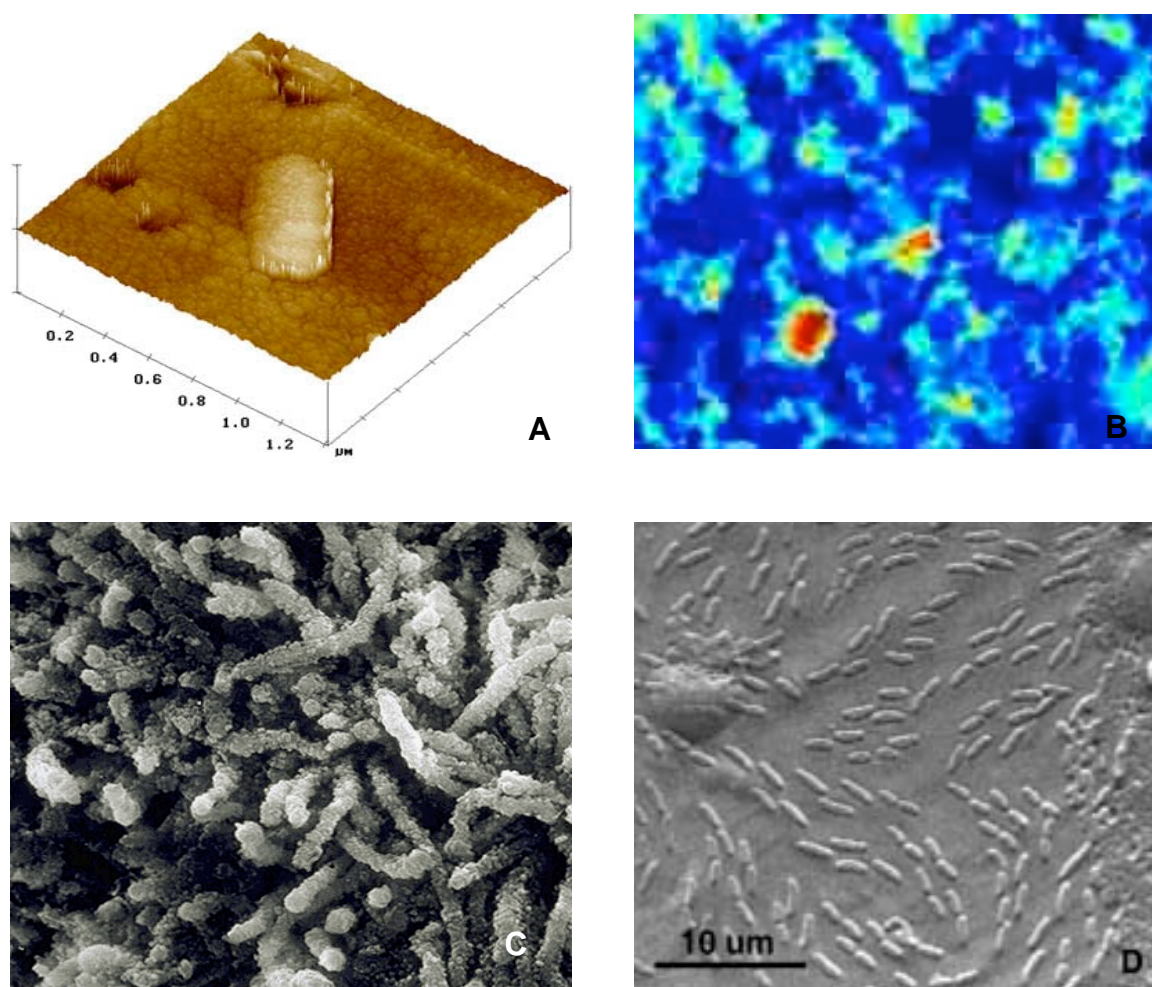


Figura 2 – Diferentes formas registadas através de A – AFM; B - CLSM; C -SEM; D - TEM

Outro método de análise de biofilmes baseia-se na utilização de microeléctrodos. A espessura dos biofilmes, em mono ou multi-camada, pode variar de 1 a 2  $\mu\text{m}$  a várias centenas de  $\mu\text{m}$ , o que suscitou o desenvolvimento de microsensores para a determinação de alguns parâmetros físico-químicos. Os primeiros estudos com microeléctrodos aplicados a biofilmes surgiram em 1969, por Bungay *et al.* (1969). Outros investigadores seguiram o seu trabalho aplicando-o a outros tipos de biofilme. Foi o caso de Chen e Bungay (1981) e de Wimpenny e Coombs (1983), que desenvolveram microeléctrodos que permitiram determinar a profundidade e a forma como se processava a penetração de oxigénio num biofilme.

Devido à informação fornecida pela CLSM acerca da irregularidade da estrutura da maior parte dos biofilmes, verificou-se que a transferência de substrato para o biofilme não era exclusivamente realizada por difusão molecular, mas também devido ao transporte convectivo.

Foram desenvolvidos inúmeros tipos de microeléctrodos, nomeadamente medidores de óxidos de azoto e oxigénio (Nielsen *et al.*, 1990); de pH,  $\text{H}_2\text{S}$  e oxigénio (Jorgensen e Revsbech, 1983); de substratos e produtos da nitrificação (de Beer *et al.*, 1993); de redução e oxidação de sulfato e sulfito, respectivamente (Kuhl e Jorgensen, 1992).

Os Métodos Moleculares são outra forma de estudo dos biofilmes. Com a aplicação de técnicas moleculares, especialmente as técnicas *in situ* de hibridização com 16S ou 23S rRNA (sonda directa de oligonucleotídeos), resolveram-se problemas como a impossibilidade de replicar a maior parte das bactérias constituintes dos biofilmes (cerca de 99,9%).

A hibridização *in situ* permitiu a detecção de sequências específicas de ácidos nucleicos de células eucarióticas e procarióticas. A análise comparativa em sequência de uma subunidade do rRNA permitiu não só a base de toda a taxonomia das bactérias (Woese 1987 e Woese e Fox, 1977) como também, através de sondas de oligonucleotídeos sintéticos, a determinação dos seus grupos filogenéticos (Olsen *et al.*, 1986).

A hibridização *in situ* combinada com técnicas avançadas de microscopia, como a CLSM, constitui um importante suporte analítico para a identificação e localização de microrganismos em ambientes complexos (Amann *et al.*, 1995).

#### **1.3.4. Modelação de biofilmes**

A modelação de determinado sistema, processo ou mecanismo, pode ser definida como a identificação de quantidades e subprocessos relevantes e respectiva descrição em formato

matemático, ou lógico (equações, regras etc.). Já por simulação se entende o que se verifica quando as equações do modelo são convertidas em algoritmos numéricos discretos (Dutta 2007).

Apesar dos mecanismos biológicos presentes em reactores de biomassa fixa ou suspensa serem semelhantes, a sua modelação por vezes é bastante diferente. Uma das grandes diferenças é a necessidade de incluir equações que descrevam os processos de transporte de compostos de e para o biofilme e para a interface entre o biofilme e a fase líquida, isto é, equações que descrevam fenómenos de difusão molecular, advecção, aderência e desprendimento. Por outro lado, as reacções biológicas dentro do biofilme podem ser modeladas de forma semelhante às utilizadas em reactores de biomassa suspensa.

Os modelos de biofilmes podem ser classificados, basicamente, em duas categorias, consoante os seus objectivos (Noguera *et al.*, 1999):

- (1) modelos para aplicações práticas de engenharia, como por exemplo modelos relacionados com dimensionamento, operação, simulação de vários problemas;
- (2) modelos desenvolvidos para investigação de forma a permitir uma melhor compreensão de fenómenos específicos do biofilme, nomeadamente estrutura, dinâmica populacional, heterogeneidade de estruturas etc.

Durante o desenvolvimento de um biofilme ocorre simultaneamente um grande número de fenómenos. Como resultado da conversão de nutrientes, verifica-se uma expansão do biofilme baseado no crescimento microbiológico e na produção de EPS, para além da necessidade de transportar compostos químicos de e para o interior do biofilme, através de processos de difusão e convecção. Adicionalmente, existe a necessidade de criação de um equilíbrio de concentrações de produtos e substratos. Esse equilíbrio é obtido pelos fluidos que atravessam a estrutura do biofilme. A junção de todos estes fenómenos cria a imagem dinâmica da estrutura tridimensional do biofilme. Contudo, é extremamente complicado simular e analisar todos estes fenómenos simultaneamente.

Os modelos matemáticos tornaram-se muito úteis porque permitiram não só testar hipóteses de âmbito mais abrangente, como também simular situações de operação muito complexas. Apesar da palavra modelação ser utilizada em diferentes situações (como já foi referido anteriormente), o resultado final é invariavelmente o mesmo – um modelo matemático é uma representação simplificada da realidade baseada em hipóteses e equações utilizadas para racionalizar observações. Aliás, a modelação deve privilegiar a simplificação máxima possível dos seus algoritmos e incorporar, até ao nível de detalhe que for necessário,



fenómenos complexos - “models should be as simple as possible and as complex as needed” (Wanner 1995).

Nas últimas duas décadas, verificou-se um grande esforço da comunidade científica para o desenvolvimento da modelação de biofilmes, numa perspectiva da sua total generalização.

Na Figura 3, mostra-se a evolução histórica conceptual da modelação da estrutura dos biofilmes (Adaptado de Veluchamy, 2006).

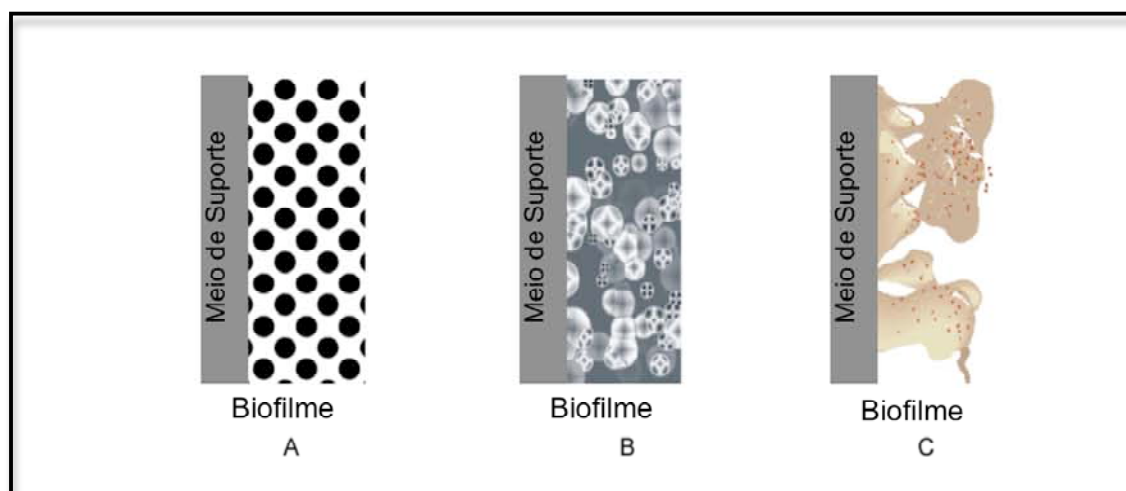


Figura 3 – Evolução conceptual da modelação de biofilmes. (A) – Biofilme com estrutura homogénea; (B) Biofilme multinutriente e multiespécie; (C) Biofilme heterogéneo composto por colónias de biomassa separadas por canais (Adaptado de Veluchamy, 2006).

### 1.3.5. Evolução da modelação de biofilmes

A modelação de biofilmes tem vindo a ser desenvolvida desde a década de 70. Os primeiros modelos basearam-se em biofilmes uniformes contendo apenas um único tipo de microrganismos e controlados exclusivamente por transporte de massa e transformações bioquímicas, admitindo apenas uma dimensão (1D) e na sua maioria incorporando fenómenos de difusão molecular (Rittmann e McCarty, 1980, Atkinson e Davies, 1974, Harremoës, 1978, La Motta, 1976 e Williamson e McCarty, 1976).

Estes modelos mostraram que a remoção de compostos orgânicos é controlada pela resistência à difusão destes compostos para o interior do biofilme, mesmo antes da sua degradação. A simplicidade foi uma característica destes modelos, tendo também, na sua maioria, sido desenvolvidos pressupondo um estado estacionário. A cinética de reacção dentro do biofilme baseava-se no conceito de substrato limitante, sendo descrita por diferentes formalismos consoante as abordagens dos diferentes autores, por exemplo através das equações de Monod para cinéticas de ordem zero e de primeira ordem.

O modelo de Williamson e McCarty, (1976) considerou o transporte de massa e a biodegradação no interior do biofilme, sendo o transporte para a interface filme líquido/biofilme e para o biofilme propriamente dito, descritos por processos de difusão (1ª Lei de Fick – eq. 1), com base nos diferentes gradientes de concentração existentes.

$$J_S = -D_f \frac{\partial C_S}{\partial Z} \quad \text{eq. 1}$$

$J_S$  – Fluxo de substrato ( $M L^{-2} T^{-1}$ )

$D_f$  – Coeficiente de difusão ( $L^2 T^{-1}$ )

$Z$  – Distância na perpendicular ao meio de suporte (L)

$C_S$  – Concentração de substrato ( $M L^{-3}$ )

Para a taxa de utilização do substrato admitiu a cinética de Monod, em que a concentração de microrganismos presente é função da concentração de substrato, através da seguinte equação (eq.2).

$$D_f \frac{d^2 S_f}{dz^2} = \frac{kX_f S_f}{K_s + S_f} \quad \text{eq. 2}$$

- $S_f$  – Concentração do substrato no biofilme ( $M L^{-3}$ )
- $X_f$  – Densidade celular ( $M L^{-3}$ )
- $K_s$  – Constante de saturação de Monod ( $M L^{-3}$ )

O modelo baseou-se numa matriz uniforme com uma distribuição homogênea no biofilme, conforme se mostrou na Figura 3 (A). Contudo, neste modelo foi incorporado o fenómeno de substrato limitante.

Rittmann e McCarty, em 1980 (1980 e 1981), desenvolveram modelos do tipo anteriormente indicado, tendo introduzido expressões que descreviam o crescimento e morte das células que constituem o biofilme e, admitindo um regime estacionário, obtiveram a expressão a seguir indicada para o cálculo da espessura do biofilme ( $L_f$ ) (eq. 3).

$$L_f = \frac{YJ}{bX_f} \quad \text{eq. 3}$$

- $Y$  – taxa de conversão biomassa / substrato eliminado (rendimento)
- $b$  – taxa de respiração endógena ( $T^{-1}$ )

Outro avanço importante deste modelo foi a introdução do conceito de concentração mínima ( $S_{min}$ ), isto é, concentração abaixo da qual os microrganismos não conseguem utilizar substrato. A remoção de substrato e o crescimento da espessura do biofilme diminuem assim que a concentração de substrato (acetato, neste caso) se aproximam de  $S_{min}$  (0,66mg/l para o caso do acetado) (eq. 4).

$$S_{min} = K_s \frac{b}{\mu_{max} - b} \quad \text{eq. 4}$$

-  $\mu_{max}$  – Taxa específica máxima de crescimento ( $T^{-1}$ )

Apesar da maior parte das conclusões retiradas deste modelo pressuporem um biofilme em estado estacionário, isto é, quando o crescimento e a perda de biomassa se igualam, foi considerada também a situação em que esse estado não é atingido. Os resultados deste modelo mostravam que determinados compostos orgânicos persistiam no meio aquático, em parte, porque a sua concentração não era suficiente para fornecer energia para a sobrevivência dos microrganismos, isto é, a sua concentração era inferior a  $S_{min}$ .

Apesar deste modelo já incluir expressões para a perda de biomassa, só Rittmann (1982), posteriormente, propôs uma expressão que veio a considerar aquele fenómeno, designado por desprendimento da biomassa (eq. 5).

$$r_{loss} = -b'X_f \quad \text{eq. 5}$$

A inclusão do fenómeno de desprendimento do biofilme constituiu um avanço importante na modelação de biofilmes, na medida em que se refere ao transporte de partículas do biofilme para a interface fase líquida / biofilme ou para a fase líquida propriamente dita, o qual permite estabelecer um balanço entre o crescimento e morte do biofilme e, consequentemente, verificar condições de estado estacionário e relativas à actividade do biofilme.

Considerando que o crescimento dos microrganismos depende de vários nutrientes (carbono, azoto, substâncias minerais etc.), a modelação procurou incorporar este aspecto (Chaudhry e Beg, 1998), tendo Bader (1978), McGee *et al.*, (1972) e Rittmann e Dovantzis (1983) introduzido o conceito de dupla limitação na cinética de crescimento do biofilme. No modelo proposto por Rittmann e Dovantzis (1983) foi assumido que a dupla limitação no biofilme ocorre quando um dos substratos é limitante próximo da interface fase líquida / biofilme e o segundo substrato é limitante na zona junto ao suporte. Desta forma, neste modelo foi previsto que cada substrato (nutriente) assume uma função fundamental no

desenvolvimento do biofilme, baseada nos seus parâmetros cinéticos (nutrientes heterólogos ou complementares).

A par destes desenvolvimentos surgiram designações para os fenómenos de dupla limitação, tendo-se classificado os tipos de nutrientes, isto é, os nutrientes que desempenhem a mesma função fisiológica, (e.g. para organismos heterotróficos dois tipos de compostos de carbono orgânico) são classificados de homólogos ou substratos perfeitamente substituíveis. Por outro lado, nutrientes que são usados para funções fisiológicas distintas são classificados como não interactivos ou ainda de nutrientes complementares. A glucose e a amónia são um exemplo de nutrientes complementares, uma vez que um não pode substituir o outro (Zinn *et al.*, 2003).

Assim, foram propostos modelos de crescimento com dois substratos limitantes, admitindo que o respectivo comportamento poderia ser descrito pela cinética de Monod (eq. 6) relativa a um único substrato, mas adaptada para dois.

$$\frac{\mu}{\mu_m} = \left( \frac{S_1}{K_1 + S_1} \right) \left( \frac{S_2}{K_2 + S_2} \right) \quad \text{eq. 6}$$

- $\mu$  – Taxa específica de crescimento dos microrganismos ( $T^{-1}$ )
- $\mu_m$  – Taxa específica máxima de crescimento dos microrganismos ( $T^{-1}$ )
- $S_1$  – Concentração do substrato 1 ( $M L^{-3}$ )
- $S_2$  – Concentração do substrato 2 ( $M L^{-3}$ )
- $K_1$  – Constante de saturação de Monod relativa ao substrato 1 ( $M L^{-3}$ )
- $K_2$  – Constante de saturação de Monod relativa ao substrato 2 ( $M L^{-3}$ )

A teoria cinética em biofilmes é baseada na diferença de gradientes de concentração de uma determinada substância a ser transportada de, ou para o biofilme. Por exemplo nos processos de remoção de CBO solúvel (biodegradação de carbono), ou de conversão de  $NH_4^+ - N$  em  $NO_3^- - N$  (nitrificação) e subsequente remoção de  $NO_3^- - N$  (desnitrificação), ocorrem, (um ou mais destes processos) dentro de um único reactor. No entanto, todas as reacções envolvidas requerem o transporte de dois componentes solúveis da fase líquida para o biofilme, que actuarão como dadores ou receptores de electrões nas respectivas reacções. Na biodegradação de carbono, o CBO solúvel actua como um dador de electrões e o oxigénio como receptor final. No processo de nitrificação o  $NH_4^+ - N$  e o oxigénio actuam como dador e receptor de electrões respectivamente. Já no processo de desnitrificação o dador de electrões será constituído por compostos orgânicos e o  $NH_3^+ - N$  como receptor final (Chaudhry e Beg, 1998).

Desta forma, nos fenómenos de difusão interna (interior do biofilme), quando a concentração de dadores e receptores de electrões é nula (situações de biofilmes muito espessos), chega-se a situações de taxas limitantes. Por outro lado, se forem analisados os fenómenos de difusão externa (transporte da fase líquida para o biofilme), altamente influenciados pela resistência difusional, poder-se-á chegar a situações de aumento de concentração de dadores e receptores de electrões. Com o objectivo de explicar estes fenómenos, vários investigadores desenvolveram critérios teóricos de forma a determinar qual o substrato limitante. Contudo todas estas teorias foram baseadas no conceito de que o substrato limitante é aquele que menos penetra no biofilme (Chaudhry e Beg, 1998).

Sendo a nitrificação um processo que produz acidez, Szwerinski *et al.*, (1986) desenvolveram um estudo que permitiu estudar a diminuição do pH em biofilmes nitrificantes. Para isso, desenvolveram um critério para determinação do substrato limitante e a transição dessa limitação de um substrato para outro através de três pares de combinações (exemplo da combinação entre o oxigénio e o azoto na eq. 7) de substratos limitantes (amónia, oxigénio e bicarbonato).

$$\frac{S_{N^*}}{S_{DO^*}} = \frac{1}{v_{DO}} \frac{D_{DO}}{D_N} \quad \text{eq. 7}$$

- $S_{N^*}$  - Concentração de azoto ( $M L^{-3}$ )
- $S_{DO^*}$  - Concentração de oxigénio ( $M L^{-3}$ )

Apesar deste estudo ter sido realizado em biofilmes desenvolvidos num tambor rotativo plano, em condições controladas, chegou-se à conclusão que se a razão entre as duas concentrações ( $S_{N^*} / S_{DO^*}$ ) no biofilme for menor que a indicada na equação (eq. 7) o oxigénio será o substrato limitante e se, por outro lado, a razão for maior, então o substrato limitante será o azoto (Chaudhry e Beg, 1998). Por outro lado, este estudo permitiu ainda verificar que as bactérias que constituem o biofilme podem degradar determinado substrato, mesmo a valores de pH muito inferiores aos registados na fase líquida (Szwerinski *et al.*, 1986).

Apesar de ser desenvolvido num reactor distinto do anterior (biofiltro de leito expandido de areia), Tanaka e Dunn (1982) realizaram uma análise semelhante. Neste estudo foi, considerado apenas o oxigénio e  $NH_4^+ - N$  como substratos limitantes. Este modelo mostrou que se a razão entre  $O_2$ ;  $NH_4^+ - N$  no biofilme for menor que o seu coeficiente estequiométrico (3,4mg/mg) então o oxigénio é o substrato limitante. Foi demonstrado ainda que, quando a concentração de oxigénio é baixa a taxa de reacção de  $NO_2$  diminui muito

mais do que a taxa de reacção do  $\text{NH}_4^+$ , resultando numa maior concentração  $\text{NO}_2$  no efluente, quando o tempo de residência é baixo.

O estudo das interacções em sistemas de culturas mistas tem sido um assunto que tem recebido uma especial atenção por parte da comunidade científica. De inúmeras interacções possíveis entre os microrganismos, destacam-se a competição por fontes de nutrientes, a competição pelo espaço e os fenómenos de predação.

Quando se verificam interacções competitivas para um determinado substrato é muito difícil atingir o estado estacionário. Este facto é facilmente explicado pela possibilidade limitada de se obter uma concentração de substrato tal que suporte a taxa específica de crescimento de organismos em competição, isto é, a probabilidade de existir uma concentração de um determinado substrato de forma a suprir as necessidades das espécies em competição simultaneamente é muito pequena (Yoon *et al.*, 1977).

O comportamento de uma cultura mista com substratos mistos depende da afinidade que esses organismos tenham para os substratos presentes. Se duas espécies têm preferência semelhante por um determinado substrato, irão competir por ele até que uma delas seja eliminada do sistema. Por outro lado, se tiverem preferências diferentes, isto é, se a sobreposição for reduzida, coexistirão, uma vez que irão ocupar nichos ecológicos diferentes (Chaudhry e Beg, 1998).

Yoon *et al.* (1977) desenvolveram estudos sobre o crescimento de organismos na presença de vários substratos, assumindo que cada substrato tem um efeito inibitório de competição quando substituído por outro. Os resultados destas investigações mostraram que a coexistência de várias espécies, em estado estacionário, em culturas contínuas, é possível mesmo quando todos os organismos têm a mesma afinidade por um determinado substrato. A explicação reside na diversidade de fontes de nutrientes presentes no sistema, capazes de suportar uma população microbiana heterogénea.

A meio da década de 80, surgiram os primeiros modelos em estado transitório (Rittmann e Brunner (1984); Chang e Rittmann, (1987 (a) e 1987 (b)), Benefiel e Molz (1985). Ao mesmo tempo surgiram os modelos dinâmicos que descreveram a distribuição e interacção de diferentes espécies presentes no biofilme (Wanner e Gujer, 1985, Wanner e Gujer, 1986, Kissel *et al.*, 1984).

Benefiel e Molz (1985) desenvolveram um modelo matemático para biofilmes em condições pseudo-estacionárias (transitórias) considerando: dupla limitação (oxigénio e substrato orgânico); transporte no filme líquido; transporte difusional de oxigénio e substrato orgânico no biofilme; população heterotrófica; reacções bioquímicas de células individuais dentro do

biofilme; crescimento do biofilme; alterações na densidade celular dentro do biofilme devido à morte dos microrganismos.

Contudo, este modelo não incorporou qualquer tipo de interacção entre microrganismos.

As aplicações numéricas deste modelo mostraram que o tempo de contacto, espessura do biofilme, e espessura da interface fase líquida / biofilme são factores que influenciam e interagem com a remoção de substrato.

Os modelos de biofilmes apresentados por Wanner e Gujer (1985, 1986) e por Kissel *et. al.*, (1984) incorporaram a interacção entre microrganismos.

Kissel *et. al.*, (1984) desenvolveram um modelo multi-espécies e multi-substratos para descrever o crescimento simultâneo de bactérias autotróficas e heterotróficas. O modelo incorporou: transferência externa de massa; transporte de massa através de difusão; cinética de Monod para a determinação interna dos nutrientes limitantes (receptores e,ou dadores de electrões); reacções competitivas; fracções biológicas inertes e activas, que variam no espaço; um reactor de mistura completa; oxidação de uma fonte orgânica de carbono; nitrificação; desnitrificação; competição entre organismos heterotróficos e autotróficos;

Devido à complexidade e rigidez inerentes ao modelo, não foi possível resolver simultaneamente as equações que o constituem. Contudo, foi realizada uma análise dimensional para identificação dos períodos característicos dos vários fenómenos presentes. Com a identificação destes períodos característicos e com a separação dos processos lentos dos processos rápidos conseguiu-se construir um modelo matemático em estado não estacionário. Através de várias simulações numéricas do modelo verificou-se que tanto a transferência de massa, como a competição pelo substrato, como ainda as taxas de crescimento e morte dos microrganismos desempenham um papel fundamental na determinação da cultura heterotrófica dominante (Chaudhry e Beg, 1998).

De forma a melhorar o modelo, Kissel *et. al.*, (1984) desencadearam uma série de estudos com o objectivo de aproximar o máximo possível da realidade a expansão, ou contracção do volume do biofilme, isto é, tentaram por interacções sucessivas descrever o crescimento espacial dos microrganismos que formam o biofilme . Para isso, dividiram o biofilme num conjunto de elementos espaciais com iguais comprimentos entre si, mas variáveis entre estudos, integrando-os no tempo. Após cada integração os comprimentos dos elementos foram recalculados de acordo com a expansão, ou contracção do seu volume (Chaudhry e Beg, 1998).

Wanner e Gujer (1985, e 1986) desenvolveram um modelo matemático de biofilme multi-espécies e multi-substratos, a uma dimensão, muito semelhante ao apresentado por Kissel *et. al.*, (1984) considerando: gradientes perpendiculares ao meio de suporte compostos por diferentes espécies microbiológicas; utilização e difusão de substrato dentro do biofilme; resistência externa de transferência de massa da fase líquida para o biofilme; crescimento da biomassa proporcional à utilização do substrato (cinética de Monod); perda de biomassa devido à respiração endógena e desprendimento (cinética de Monod simples); diferentes densidades microbianas para as várias espécies, mas constantes ao longo do biofilme; formação de biomassa inerte.

O modelo permitiu simular alterações na espessura do biofilme, bem como a distribuição espacial dos microrganismos e dos substratos no interior deste. Permitiu ainda simular o desprendimento (“detachment”) do biofilme, transferência externa de massa e alterações da concentração de nutrientes na massa de água.

O modelo permitiu verificar, de novo, que a relação entre a produção de biomassa e a expansão do volume do biofilme era efectiva. Foram admitidas, no entanto, algumas simplificações, nomeadamente: (1) biomassa contínua, tendo sido negligenciados aspectos relacionados com a forma, dimensão e localização dos microrganismos; (2) uma única direcção espacial e (3) não foram incorporados, deliberadamente, aspectos específicos relativos à cinética dos microrganismos (Chaudhry e Beg, 1998).

À semelhança do modelo anterior, o modelo de Wanner e Gujer incluiu o fenómeno de crescimento espacial dos microrganismos. Este modelo baseou-se numa aproximação contínua através de médias espaciais de pequenas fracções volúmicas do biofilme. Para melhorar a sua análise e discussão, foram assumidas várias simplificações de forma a permitir que o modelo tivesse um tratamento numérico.

Apesar dos modelos de Kissel *et al.* e de Wanner e Gujer serem muito semelhantes, e terem sido desenvolvidos para estados não estacionários, apresentaram descrições diferentes da forma como se processa o crescimento da biomassa num biofilme.

Apesar de todas as limitações destes modelos, foi através deles que se conseguiu pela primeira vez representar um biofilme estratificado e dinâmico e, simultaneamente, incorporando os conceitos de multi-substrato e de multi-espécie.

São as seguintes as equações fundamentais do modelo:

- Balanço de massa para a espécie microbiológica



$$\frac{\partial C_X}{\partial t} = -\frac{\partial J_X}{\partial Z} + r_X \quad \text{eq. 8}$$

$$J_x = u_F C_X \quad \text{eq. 9}$$

- $J_x$  - Fluxo de massa ( $M L^{-2} T^{-1}$ )
- $r_X$  – Taxa de reacção relativa à espécie microbiológica ( $M L^{-3} T^{-1}$ )
- $Z$  – Direcção perpendicular ao suporte (L)

Onde,  $C_X$  é a concentração de biomassa ( $M L^{-3}$ ) e  $u_F$  é a velocidade com que a biomassa ( $L T^{-1}$ ) é desprendida do meio de suporte, dada por

$$\frac{1}{A} \frac{dV}{dt} = u_F = \frac{1}{C_{X_{tot}} \int_0^Z \sum_{i=1}^{nX} r_{X_i} dz} \quad \text{eq. 10}$$

O desenvolvimento, ao longo do tempo, da espessura do biofilme ( $L_f$ ) é obtida por

$$\frac{dL_f}{dt} = u_L \quad \text{eq. 11}$$

onde  $u_L$  é a velocidade na superfície do biofilme ( $L T^{-1}$ )

- Balanço de massa a uma dimensão (1D) para um substrato dissolvido no biofilme

$$\frac{\partial C_S}{\partial t} = \frac{\partial J_S}{\partial Z} + r_S \quad \text{eq. 12}$$

- $r_S$  – Taxa de reacção do substrato ( $M L^{-3} T^{-1}$ )
- $J_S$  – Fluxo de substrato ( $M L^{-2} T^{-1}$ )

$$- \text{Fluxo de Substrato (difusão)} - \text{Lei de Fick} \quad (\text{eq. 1})$$

Rittmann e Manem (1992) foram responsáveis por um grande avanço na modelação de biofilmes, conseguindo desenvolver um modelo multi-espécie em estado estacionário. O modelo incorporou múltiplas espécies activas, biomassa inerte, utilização e difusão do substrato no biofilme, transferência externa de massa e o desprendimento do biofilme. O modelo permitiu prever, em estado estacionário, valores para a espessura do biofilme, para a distribuição de espécies e para os fluxos de substratos.

Uma avaliação experimental do modelo, num reactor de mistura completa, permitiu verificar interações entre espécies (bactérias nitrificantes e bactérias heterotróficas consumidoras de acetato) em competição pelo espaço, não incluindo, no entanto, a competição por um substrato (ex. Oxigénio). Permitiu verificar ainda, que a concentração de  $\text{NH}_4\text{-N}$  à saída do reactor aumentava com o incremento de substrato. A explicação apresentada para este aumento da concentração de  $\text{NH}_4\text{-N}$ , residiu no aumento da resistência interna de transferência de massa, devido à acumulação de microrganismos autotróficos (bactérias nitrificantes) nas camadas mais interiores do biofilme.

Gadani *et al.* (1993) aperfeiçoaram os modelos anteriores, incluindo condições transitórias. Foi também introduzida uma aproximação do fenómeno de desprendimento de biomassa, à semelhança do modelo de Rittmann e McCarty (1980, 1981). O modelo incorporou biomassa inerte, difusão e taxas de utilização de substrato dentro do biofilme e várias camadas de difusão, permitindo simular a evolução da espessura do biofilme e diferentes distribuições espaciais das espécies microbiológicas e da concentração do substrato no interior do biofilme. Gadani *et al.*, (1993) apresentaram ainda uma descrição do modelo a 0D (modelo de dimensão zero - porque não foi introduzida qualquer coordenada espacial) em estado transitório. No entanto, mesmo sendo um modelo com algumas limitações, permitiu prever a evolução da espessura do biofilme, a concentração de substrato na fase líquida e biofilme e a fracção activa de biomassa ocupada por cada espécie (bactérias nitrificantes de crescimento lento e bactérias heterotróficas consumidoras de acetato) (Wimpenny, 1997).

Furumai e Rittmann (1994) desenvolveram um modelo simplificado multi-espécie com uma distribuição por camadas da biomassa, tendo-o aplicado para verificar a estabilidade do processo de nitrificação, tanto em biofilmes como em biomassa em suspensão.

O modelo procurou incorporar a resistência na transferência de massa para todos os substratos, bem como a formação e consumo de compostos solúveis resultantes da actividade microbiológica (Chaudhry e Beg, 1998).

Das simulações deste modelo concluiu-se que os processos de biomassa fixa são mais estáveis do que os que utilizam biomassa em suspensão, dado que os organismos nitrificantes (caracterizados por terem um crescimento mais lento) estão protegidos pelos organismos heterotróficos (localizados na superfície exterior do biofilme) o que impede, ou retarda, o desprendimento dos primeiros (Nogueira *et al.*, 2005). Contudo, verificou-se que se o crescimento dos organismos heterotróficos for muito intenso, devido a cargas de substrato elevadas, poderá ocorrer um retrocesso da nitrificação devido a limitações de oxigénio dissolvido e ao aumento da resistência difusional para as camadas mais interiores. Desta forma, a camada superficial de organismos heterotróficos tem vantagens e

desvantagens para o processo de nitrificação, dependendo das condições de desprendimento da biomassa e do fornecimento de oxigénio (Nogueira *et al.*, 2002).

Wanner e Reichert (1996) aperfeiçoaram o modelo de Wanner e Gujer (1985 e 1986), tendo adoptado uma descrição mais flexível para o transporte de compostos dissolvidos para o biofilme, considerando ainda: transporte difusional de compostos particulados para a matriz sólida do biofilme; alterações na porosidade do biofilme; fenómenos de desprendimento e agregação simultânea de células e partículas à superfície do biofilme.

O modelo foi ainda implementado no programa AQUASIN de forma a poder-se discutir a introdução destes novos processos no modelo clássico de biofilmes de culturas mistas.

O conceito da existência de biomassa “adormecida” no biofilme foi pela primeira vez abordado por Imai *et al.* (1994 e Chaudhry e Beg, 1998), para caracterizar a fracção que se encontra inactiva embora podendo restabelecer a sua actividade pelo fornecimento de substrato. O aparecimento deste conceito surgiu através da medição, em ensaios “batch”, da actividade específica de cada tipo de biomassa, nomeadamente consumo de substrato presente no biofilme. Surgiu assim o modelo que descreve o biofilme através de camadas e incorporando a fracção de biomassa “adormecida”.

A utilização de microeléctrodos para demonstrar a competição pelo espaço e pelo substrato dentro do biofilme foi efectuada por Zhang *et al.* (1994). As experiências mostraram que (i) um aumento da carga orgânica conduz a uma diminuição da concentração do oxigénio dissolvido no biofilme, contudo quando se atinge um determinado valor, o perfil da concentração de oxigénio dissolvido no biofilme deixa de se alterar, (ii) as bactérias heterotróficas competem com as bactérias nitrificantes por oxigénio, resultando numa inibição do processo de nitrificação e (iii) a competição por substrato nos biofilmes conduz a uma estrutura de biofilme estratificada. Foi ainda possível verificar que a distribuição espacial de componentes bióticos e abióticos, afecta de facto a transferência de substrato para o biofilme e a competição entre espécies.

Outro estudo experimental que veio confirmar a existência de várias camadas no biofilme, ocupadas por diferentes espécies, e a importância da incorporação deste fenómeno nos modelos matemáticos, foi desenvolvido por van Loosdrecht *et al.*, (1995), que estudou a distribuição populacional de organismos nitrificantes e heterotróficos, recorrendo a um eléctrodo de oxigénio. Foi observado que a estrutura interna do biofilme era extremamente heterogénea com muitos poros e protuberâncias, isto é, o perfil de oxigénio diferiu muito de local para local (de colónia para colónia) e entre partículas (colónias) da mesma amostra, quando o atrito provocado pela passagem de ar e água era baixo. Por outro lado, quando estas forças de atrito aumentavam, van Loosdrecht *et al.* verificaram que apenas uma parte

de biofilme se desenvolvia, isto é, em estado estacionário, para além da densidade do biofilme ser regulada pelo atrito, o crescimento deste também é balanceado pelo seu desprendimento.

Skowlund (1990) tinha chegado à mesma conclusão de van Loosdrecht *et al.* quando estudou o efeito do crescimento do biofilme em estado estacionário, utilizando o modelo desenvolvido por Wanner e Gujer (1985 e 1986), tendo demonstrado que a utilização deste procedimento se justificava em biofilmes limitados e não limitados através do atrito, isto é, em biofilmes cujo crescimento (aumento da sua espessura) não é maior porque estão sujeitos a forças de atrito (ex. biofilmes que crescem em reactores que estão em movimento).

Para biofilmes não limitados, Skowlund mostrou que apesar de a espessura total continuar a aumentar ao longo do tempo, o volume de biofilme activo atinge um valor constante. Para além disso, os perfis de microrganismos activos dentro do biofilme e na interface fase líquida / biofilme também se mantêm constantes. Da mesma forma, para um biofilme limitado por atrito, assim que a espessura atinge um determinado limite, o volume activo do biofilme, o consumo de substrato e os perfis de microrganismos activos tornam-se independentes da espessura.

Relativamente ao desprendimento do biofilme foi desenvolvido por Stewart (1993) um modelo matemático que, através de uma base teórica, permitiu a resolução de muitas das expressões empíricas propostas na literatura relativas a este fenómeno (Chaudhry e Beg, 1998).

Por outro lado, um avanço significativo na modelação de biofilmes foi obtido com a incorporação de interacções iónicas e do efeito do pH, na descrição do transporte de massa e da reacção biológica Flora *et al.* (1993, 1995 (a), 1995 (b) e 1995 (c)).

Este modelo incluiu: equação de Nernst – Plank – equação para definir o fluxo de difusão de espécies iónicas; lei de Fick – equação para o representar o fluxo difusional de espécies neutras; resistência de transferência externa de massa; modelo em estado estacionário em que o carbono era limitante (Chaudhry e Beg, 1998).

#### **1.3.6. Desenvolvimento recente da modelação de biofilmes**

Como anteriormente referido, na última década observou-se um certo redireccionamento na modelação de biofilmes.

Os modelos iniciais descreviam os biofilmes como materiais homogêneos, em estado estacionário e como se contivessem uma única espécie bacteriana, incorporando fenômenos de transporte de massa e transformações bioquímicas. São modelos a 1D que se socorrem apenas de uma dimensão face à uniformidade que assumem.

Posteriormente, foram desenvolvidos formalismos dinâmicos, estratificados, capazes de descrever biofilmes multi-espécie e multi-substrato. Contudo, não incorporaram a heterogeneidade da estrutura do biofilme, isto é, o tipo de estrutura do biofilme era uma condição inicial.

No entanto, através de técnicas sofisticadas (CSLM), Costerton *et al.*, (1994) vieram demonstrar que os biofilmes são estruturas muito heterogêneas, constituídas por agrupamentos de células, que se desenvolvem de forma mais ou menos independente, materializando poros e canais de dimensão micrométrica. Estas observações mostraram ainda que a concentração de oxigénio varia consideravelmente entre os grupos de células e os canais de maior dimensão, levando a uma interpretação tridimensional da estrutura do biofilme, o que implica dispor de uma informação de base muito exigente.

A compreensão da estrutura do biofilme tornou-se ainda mais importante não só devido a aspectos relacionados com uma melhor caracterização da respectiva morfologia, mas porque tal era necessário para a descrição de fenômenos de transferência de massa no interior e na superfície de contacto do biofilme com a fase líquida (Hermanowicz, 2001).

Picioreanu *et al.*, (1998 (a), 1998 (b) e 1999) e Noguera *et al.*, (1999) apresentaram descrições microbiológicas do biofilme, incorporando não só o transporte de massa, como também aspectos hidrodinâmicos e da dinâmica das populações. Nos modelos de Picioreanu *et al.*, foi incluído o conceito de “cellular automaton” (CA), em que as células são tratadas como entidades discretas. Estas entidades são associadas ao espaço que está dividido numa quadrícula uniforme, de dimensões conhecidas e que constituem as unidades básicas do modelo. Às unidades podem ser atribuídos diferentes estados, isto é, ocupado ou vazio, permitindo desta forma o seu tratamento isoladamente no tempo. A mudança do estado destas unidades é controlada através de regras dependentes das condições locais, nomeadamente que envolvem o fornecimento de nutrientes às unidades em análise, embora cada unidade possa ser regida de forma independente. Desta forma, este modelo permite prever o crescimento do biofilme numa perspectiva tridimensional conseguindo relacionar esse crescimento com, por exemplo, o fluxo de substrato em cada unidade básica do modelo.

Recentemente, surgiram os chamados modelos híbridos, que combinam aproximações do modelo do “cellular automaton” (CA) com o fluxo de substrato nas várias zonas do biofilme.

Esta evolução na complexidade dos modelos foi possível devido aos avanços muito significativos de ferramentas informáticas, como é o caso do programa AQUASIM e MATHLAB.

Hermanowicz (2001), desenvolveu um modelo 2D baseado no conceito de “cellular automaton” (CA), o qual considera apenas uma única espécie de microrganismos e a limitação de um nutriente. Os resultados deste modelo mostraram que uma pequena alteração na concentração do nutriente considerado poderá influenciar o desenvolvimento do biofilme. Para além disso, este modelo veio ainda mostrar que quanto menor for a interface fase líquida /biofilme, mais denso e compacto é o biofilme, devido à resistência de transferência de massa, que neste caso é menor. Nesta situação foram observadas, em maior número, formas em cogumelo e tulpas das colónias do biofilme. O modelo permitiu não só simular uma série de distintas morfologias de biofilme, como também sugeriu que a diversidade verificada poderá resultar da organização individualizada das unidades consideradas, as quais são reguladas através de regras simplificadas e localizadas. As diferenças estruturais do biofilme obtidas resultaram da alteração de características básicas ambientais, não tendo sido impostas à partida.

Estes modelos são muitas vezes referidos na literatura como baseados na biomassa (“biomass based models – BbMs”), ou modelos de população espacialmente estruturada (Kreft *et al.*, 2001). Esta classificação deve-se ao facto de neste tipo de modelos a estrutura do biofilme ser uma característica resultante das acções e interacções das unidades consideradas entre elas e com o ambiente que as rodeia.

Kreft *et al.*, (2001), desenvolveram um modelo baseado nos BbMs, no qual as acções, interacções e propriedades descritas, não são as da biomassa mas sim as de indivíduos (células bacterianas) de forma a poder compreender a população ou a comunidade. Em contraste com os modelos BbMs, estes são, designados por modelos baseados em indivíduos (“individual-based modelling – IbM”), permitiram interpretar individualmente os organismos, células bacterianas neste caso, considerados como entidades fundamentais.

Este modelo foi aplicado a duas espécies bacterianas (bactérias que oxidam amónia e nitrito), e simulado em 2D e 3D, isto é, para a difusão e reacção do substrato foi utilizada uma definição espacial a 2D e para as bactérias, de forma a permitir os mesmos graus de liberdade do movimento celular que existem na realidade, um espaço a 3D. No modelo foi considerada a equação de Monod para descrever a taxa de consumo de azoto ( $v_N$ ), admitindo uma dupla limitação de substrato (azoto e oxigénio) (eq. 13) e uma relação entre esta taxa e a de consumo de oxigénio ( $v_O$ ), através da eq. 14,

$$v_N = M_X V_{\max, N} \left[ \frac{C_N}{K_{S,N} + C_N + C_N^2 / K_{i,N}} \right] \left[ \frac{C_O}{K_{S,O} + C_O} \right] \quad \text{eq. 13}$$

sendo  $M_X$  a quantidade de biomassa (matéria seca),  $V_{\max, N}$  a taxa máxima específica de consumo de azoto,  $C_N$  e  $C_O$  as concentrações dos respectivos substratos,  $K_S$  a constante de saturação de Monod e  $K_i$  a constante de inibição do substrato.

$$v_O = v_N \frac{Y_N}{Y_O} \quad \text{eq. 14}$$

$Y_N$  é o rendimento de crescimento celular devido ao azoto (dador de electrões) e  $Y_O$  é o rendimento de crescimento celular devido ao oxigénio (receptor de electrões).

A concentração de substrato solúvel e os produtos de reacção são dados através do balanço de massa descrito pela eq. 15.

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = D_i \left( \frac{\partial^2 C_i}{\partial X^2} + \frac{\partial^2 C_i}{\partial Z^2} \right) + r_i \quad \text{eq. 15}$$

sendo  $D$  o coeficiente de difusão e  $r$  a taxa de reacção para cada composto.

Analisando estes dois tipos de modelos (BbM e lbM), chegou-se à conclusão que o comportamento do modelo BbM é melhor quando se trata de sistemas a uma escala macroscópica, o que é particularmente importante quando se está a caracterizar heterogeneidades a nível global do sistema. Conclui-se também que durante o crescimento do biofilme a sua forma é muito influenciada por fenómenos de reacção e difusão de substrato e pelo mecanismo de crescimento da biomassa (forma de ocupação e expansão da biomassa no espaço).

Aquele modelo foi ainda aperfeiçoado por Kreft e outros investigadores que introduziram a influência da produção de substâncias extracelulares poliméricas (EPS) na estrutura do biofilme (Kreft e Wimpenny, 2001 (a) e Kreft e Wimpenny, 2001 (b)).

Chang *et al.*, (2003) desenvolveram um modelo lbM, 3D, CA, incorporando a difusão discreta Browniana, utilizando várias técnicas (transporte de nutrientes independente) que permitiram a simulação tridimensional do transporte destes produtos, de forma a permitir uma melhor interpretação dos efeitos provocados pela heterogeneidade da concentração de

nutrientes. Este estudo englobou dois cenários, sendo o primeiro relativo à limitação de transporte de nutrientes dentro do biofilme e, com o segundo, pretendeu-se avaliar a influência do fenómeno de auto-inibição (inibição provocada pelos produtos finais da síntese metabólica).

Nesse estudo verificou-se que tanto as limitações de transporte de nutrientes, como a produção de metabolitos auto-inibitórios influenciam a formação dos canais constituintes da estrutura do biofilme.

Por outro lado, os modelos lbM permitem incorporar e analisar espécies e fenómenos específicos, (ex. fenómenos de mutação) proporcionando um maior grau de detalhe e um aprofundamento significativo do conhecimento relativo à formação do biofilme. Contudo, o elevado detalhe necessário para a descrição do biofilme pode ser uma desvantagem, nos casos de modelação de sistemas heterogéneos a uma escala macroscópica. Para além disso, é evidente que os modelos lbM requerem recursos computacionais mais expeditos do que, por exemplo, os modelos BbM.

Para tentar reconciliar a extensão e grau de detalhe dos modelos lbM com os recursos disponíveis, foi proposto por Picioreanu *et al.*, (2004) um modelo baseado em partículas, multi-dimensional e multiespécie, vindo a traduzir-se numa versão ampliada de um lbM. O modelo inclui os seguintes factores: (i) três categorias de biomassa activa (bactérias aeróbias oxidativas de amónia, bactérias aeróbias oxidativas de nitrito e bactérias anaeróbias oxidativas de amónia); um único tipo de biomassa inerte – resultante da morte da biomassa activa; representação 3D da estrutura do biofilme, através de esferas que representam as partículas de biomassa. Cada esfera contém apenas um tipo de biomassa activa e uma fracção de biomassa inerte. Foi considerada uma densidade constante para as partículas, podendo variar a massa e o volume da partícula ao longo do tempo; crescimento diferenciado da biomassa (para cada tipo de biomassa (representadas por “b” na eq. 16)) descrito através de um balanço de massa para cada partícula (p) (eq. 16);

$$\frac{dm_{X,b}^{(p)}}{dt} = r_{X,b} \quad p = 1,2,\dots, N_p \text{ e } b = 0,1,2,\dots, N_B \quad \text{eq. 16.}$$

$m_{X,b}^{(p)}$  representa o somatório da biomassa activa da partícula p

(ii) divisão da biomassa – em que prevalece uma determinada direcção para o crescimento celular consoante o tipo de microrganismo; expansão da biomassa (“biomass spreading”) – este fenómeno ocorre devido ao crescimento da biomassa; desprendimento da biomassa – consistiu na remoção de todas as partículas, que ao se sobrepor umas às outras,



impunham uma espessura ao biofilme superior à que é assumida à partida, isto é, foi considerada uma espessura constante do biofilme; balanços de massa para os substratos solúveis (n) no biofilme. A distribuição espacial da concentração de substratos, de produtos, etc, influencia a taxa de crescimento de cada tipo de biomassa e, consequentemente, a distribuição espacial das bactérias. Devido ao crescimento, divisão, expansão e desprendimento da biomassa, a distribuição espacial dos microrganismos varia no tempo, o que origina uma variação também da concentração de substrato. Por esta razão, a eq. 17, inclui expressões de reacção e difusão relativas aos balanços de massa em estado dinâmico.

$$\frac{\partial C_{S,n}}{\partial t} = D_n \left( \frac{\partial^2 C_{S,n}}{\partial X^2} + \frac{\partial^2 C_{S,n}}{\partial Y^2} + \frac{\partial^2 C_{S,n}}{\partial Z^2} \right) + r_{S,n} \quad n = 1, 2, \dots, N_s \quad \text{eq. 17}$$

(iii) balanços de massa para os substratos solúveis (n) na fase líquida (eq. 18)

$$\frac{dC_{S,n}^{(b)}}{dt} = \frac{Q}{V} (C_{S,n}^{(in)} - C_{S,n}^{(b)}) + \frac{A_F}{V L_Y L_Z} \int_0^{L_X} \int_0^{L_Y} \int_0^{L_Z} r_{S,n}(X, Y, Z) dZ dY dX \quad \text{eq.18}$$

$$n = 1, 2, \dots, N_s$$

Através deste modelo foi possível não só descrever processos físico-químicos, como sejam o transporte e reacção de substratos, mas também caracterizar o comportamento da biomassa de uma forma mecanística e extremamente abrangente a partir de acções e interacções (crescimento, divisão e movimento) à escala da partícula (colónia) ou até mesmo individual.

Simultaneamente com o modelo de Picioreanu *et al.*, (2004), surgiu o trabalho de Laspidou e Rittmann (2004) que desenvolveram um modelo 2D, baseado no conceito CA, multi-componente e unificado (UMCCA), que permitiu quantificar a heterogeneidade do biofilme, tendo considerado todas as componentes que o constituem, nomeadamente três espécies sólidas (biomassa activa, biomassa morta ou inerte e EPS) e três componentes solúveis (substratos solúveis e dois tipos de produtos microbiológicos (SMP)).

O modelo utilizou uma representação discreta da fase sólida através do conceito de CA e os métodos clássicos contínuos para os componentes solúveis, vindo permitir unificar e integrar várias componentes e as suas respectivas densidades, nomeadamente os vários tipos de biomassa (activa e inerte), as EPS e os SMP, que até então eram tratadas de forma individualizada, propondo o conceito de densidade composta, ou seja a densidade que inclui as várias componentes. No entanto, e apesar das componentes poderem estar integradas,

foi possível também analisá-las individualmente, isto é, o modelo também permite verificar a distribuição, no espaço e no tempo, das várias componentes.

O modelo considera ainda os seguintes aspectos: cinética dupla de Monod para representar a taxa de consumo de oxigénio e substrato; balanços de massa independentes para o substrato (dador), produtos associados à utilização de substrato (UAP), produtos associados à biomassa (BAP), biomassa activa ( $X_a$ ), biomassa inerte ( $X_{res}$ ), e EPS incluindo em todas as expressões um termo para o estado não estacionário; um perfil para o oxigénio e a definição da densidade composta ( $CompDen^{i,j}$ ),

$$CompDen^{i,j} = X_a^{i,j} x_{\max} + EPS^{i,j} eps_{\max} + X_{res}^{i,j} x_{res,\max} \quad eq.19$$

$x_{a,\max}$ ,  $eps_{\max}$  e  $x_{res,\max}$ , representam as densidades máximas de cada compartimento.

A densidade composta é obtida multiplicando a fracção de cada espécie sólida pela sua máxima densidade, isto é, cada compartimento incorpora os três componentes da biomassa, cada um com uma única fracção na sua densidade máxima. Foi considerado ainda que cada compartimento era homogéneo no que respeita às componentes da biomassa.

- definição da razão de consolidação ( $U_c$ ) (eq.20);

$$U_c = 1 - 0,9820 \exp(-0,0315 t_c) \quad eq.20$$

$t_c$  – tempo de consolidação (T)

Ao incluir forças horizontais e verticais, bem como vibração, o modelo simulou a consolidação do biofilme (através da introdução de  $U_c$  que aumenta com a idade da biomassa), ou seja, simulou uma maior densidade do biofilme. A introdução deste fenómeno permitiu representar as diferenças de densidade ao longo do biofilme, o que tem sido confirmado experimentalmente.

No Quadro 1 mostra-se, resumidamente, algumas das principais características dos modelos referidos anteriormente.

Quadro 1 – Resumo dos principais modelos e respectivas características

Autor	Nº substratos	Formalismo	Cresc. e perda de células	Espessura biofilme	Geometria do biofilme	Outro fenómeno	Ano
Atkinson e Davies	1	Monod	-	Constante no tempo	Plana – 1D	-	1974
Williamson e McCarty	1	Monod	-	Constante no tempo	Plana – 1D	1 Subs. limitante	1976
Rittmann e McCarty	1	Monod	✓	Constante no tempo	Plana – 1D	S <sub>min</sub> Crescimento e morte celular Eq. da espessura do biofilme	1980
McGee <i>et al.</i>	2	Monod (“double Monod – interactive”)	✓	Constante no tempo	Plana – 1D	Subs. limitantes – Dupla limitação	1972
Szwerinski <i>et al.</i>	2	Monod (“double Monod – interactive”)	-	Constante no tempo	Plana – 1D	Subs. Limitantes - Transferência de subs. limitantes; O <sub>2</sub> ; N; bicarbonato.	1986
Tanaka e Dunn	2	Monod (“double Monod – interactive”)	-	Constante no tempo	Plana – 1D	Subs. limitantes - Dupla limitação; NH <sub>4</sub> ; O <sub>2</sub>	1982
Rittmann e Dovantzis	1 / 2	Monod	-	Constante no tempo	Plana – 1D	Subs. limitantes - Dupla limitação	1983
Benefield e Molz	2	Monod (“double Monod – interactive”)	✓	Constante no tempo	Plana – 1D	Espécie heterotróficas pseudo-estacionário	1985
Kissel <i>et al.</i>	Múltiplos	Monod (“double Monod – interactive”)	✓	Variável no tempo	Plana – 1D	Multi-substrato Multi-espécie Interação entre micror. Estratificado Dinâmico Não estacionário	1984
Wanner e Gujer	Múltiplos	Monod (“double Monod – interactive”)	✓	Variável no tempo	Plana – 1D	Multi-substrato Multi-espécie Interação entre micror. Estratificado Dinâmico Desprendimento da biomassa	1985 e 1986
Rittmann e Manem	Múltiplos	Monod (“double Monod – interactive”)	✓.	Variável no tempo	Plana – 1D	Multi-substrato Multi-espécie Interações entre microrganismos Estratificado Dinâmico Estado estacionário	1992

Quadro 1 – Resumo dos principais modelos e respectivas características (cont.)

Autor	Nº substratos	Formalismo	Cresc. e perda	Espessura biofilme	Geometria do modelo	Outro fenómeno	Ano
Gadani <i>et al.</i>	Multiplos	Monod (“double Monod – interactive”)	✓	Variável no tempo	Plana – 1D	Multi-substrato Multi-espécie Interações entre micror. Estratificado Dinâmico Estado estacionário Desprendimento da biomassa	1993
Furumai e Rittmann	Multiplos	Monod (Formulação multiplicativa)	✓	Variável no tempo	Plana – 1D	Multi-substrato Multi-espécie Interações entre microrganismos  Estratificado Dinâmico Estado estacionário Desprendimento da biomassa	1994
Wanner e Reichert	Multiplos	Monod (“double Monod – interactive”)	✓	Variável no tempo	Plana – 1D	Multi substrato Multi-espécie Interações entre micror. Estratificado com alterações da porosidade Dinâmico Desprendimento e agregação simultânea de células Transporte difusional de compostos particulados para a matriz	1996
Imai <i>et al.</i>	Multiplos	Monod (associada ao consumo de cada substrato)	✓	Variável no tempo	Plana – 1D	Multi-substrato Multi-espécie Estratificado Dinâmico Introdução do conceito de biomassa adormecida	1994
Flora <i>et al.</i>	Multiplos-moléculas e iões	Monod (depend. do pH)	-.	Constante no tempo	Plana – 1D	Multi-substrato Multi-espécie Interações iónicas e efeito do pH	1993 1995
Picioreanu <i>et al.</i>	1	Monod	✓	Variável no tempo	2D e 3D	Multi-espécie Interações aprofundadas entre microrganismo. Introdução do conceito de Automato Celular Modelo baseado na biomassa	1998

Quadro 1 – Resumo dos principais modelos e respectivas características (cont.)

Autor	Nº substratos	Formalismo	Cresc. e perda	Espessura biofilme	Geometria do modelo	Outro fenómeno	Ano
Noguera <i>et al.</i>	1	Monod	√.	Variável no tempo	3D	Multi-espécie Interações aprofundadas entre microrganismos, nomeadamente ao nível da dinâmica de populações Modelo baseado na biomassa	1999
Hermanowicz	1	Monod	√	Variável no tempo	2D	Modelo baseado na biomassa Conceito de Automato Celular Mono-espécie	2001
Kreft <i>et al.</i>	2	Monod	√	Variável no tempo	2D e 3D	Introdução do conceito de modelo baseado em indivíduos	2001
Chang <i>et al.</i>	Multiplos	-	√	Variável no tempo	3D	Modelo baseado em indivíduos Conceito de Automato Celular Efeito de auto-inibição Mono-espécie	2003
Piciooreanu <i>et al.</i>	Multiplos	Monod	√	Variável no tempo	3D	Modelo baseado em partículas Vários tipos de biomassa Multi-espécie Fenómeno de expansão da biomassa	2004
Lapidou e Rittmannl.	Multiplos	Monod	√	Variável no tempo	2D	Conceito de Automato Celular multi-componente unificado Definição de densidade composta Definição de razão de consolidação	2004

(Adaptado de Chaudhry e Beg, 1998)

Apesar de actualmente a investigação sobre biofilmes lidar com fenómenos microbiológicos extremamente complexos, a compreensão das cinéticas envolvidas ainda se restringe à degradação de substratos solúveis. No entanto, têm sido desenvolvidos esforços para que a modelação possa incorporar informação sobre a degradação de matéria orgânica coloidal em reactores de biomassa fixa (Larsen *et al.*, 1994).

### 1.3.7. Cinética de reacção biológica

Nos processos biológicos, o conhecimento da cinética de remoção de substrato é importante para a respectiva concepção e dimensionamento, na medida em que permite a interpretação da reacção envolvida, nomeadamente das suas limitações e potencialidades. A avaliação da cinética é, normalmente, efectuada através de ensaios específicos, realizados sob condições experimentais conhecidas, o que permite simular o comportamento da população biológica, ou mesmo promover a predominância de espécies com maior afinidade para o substrato (Wanner, 1994).

Tratando-se de culturas mistas, as condições impostas, antes ou durante a realização dos ensaios, tem ainda maior importância, uma vez que poderão determinar a selecção de algumas espécies (Domingos, 1999). Com efeito, pela análise dos valores de constantes cinéticas, referenciadas em diversos estudos, constata-se que são pouco homogéneos, especialmente quando obtidos em ensaios realizados em reactores “batch”, o que se admite poder estar relacionado com a história da cultura, para além das espécies bacterianas presentes (Grady *et al.*, 1996 e Templeton e Grady, 1988). A história da cultura, englobando aspectos relativos à selecção dos microrganismos, à sua afinidade para o substrato e à respectiva capacidade de adaptação a novos ambientes, pode alterar o estado fisiológico inicial da cultura que, conforme demonstrado por Daiger e Grady (1982 (a) e 1982 (b)), tem impacte significativo na cinética de biodegradação.

Monod, e mais tarde Chudoba (Chudoba, 1989, Grady *et al.*, 1996, Okpokwasili, e Nweke, 2005), nos estudos relativos à formulação do seu modelo cinético tinha já evidenciado que as culturas bacterianas passam por “crises”, que modificam, profundamente, as suas propriedades, verificando ainda que a idade das culturas pode influenciar a morfologia das células bacterianas. Em geral, a dimensão das células altera-se ao longo do crescimento, dentro da mesma cultura, passando por um máximo no fim da fase de latência, permanecendo constante na fase exponencial e diminuindo de seguida. Estas razões, levaram Monod a questionar a forma como a biomassa é avaliada, a qual pode, variar da simples enumeração à quantificação, centrada em características específicas, o que pode conduzir também a informação pouco homogénea.

Relativamente à descrição da cinética de biodegradação, para além de aspectos conceptuais de base, esta requer, necessariamente, a quantificação das constantes cinéticas envolvidas, constatando-se que se lhe podem associar questões matemáticas e de terminologia.

Quanto ao primeiro tipo de questões, a quantificação de constantes está dependente da capacidade de rotinas matemáticas disponíveis para estimarem os respectivos valores,

sendo comuns as dificuldades de validação de alguns valores, como por exemplo quando há parâmetros que não são independentes. Nestes casos, a validade das estimativas é questionável, independentes do rigor que possa ter sido posto nos ensaios laboratoriais.

A base matemática para estimar parâmetros cinéticos dos processos microbiológicos tem utilizado formas derivadas, e integradas, das equações associadas às reacções de catálise enzimática, o que tem sido realizado por ajustamento de funções a dados gerados experimentalmente, como nos estudos de Counotte e Prins (1979), Duggleby e Morrison (1977) e por Robinson *et al.*, (1983), entre outros. A equação de Monod pode ser utilizada para estimar parâmetros cinéticos de crescimento, tendo, no entanto, presente que as respectivas estimativas poderão estar influenciadas pela história do crescimento do inóculo. Para além disso, a adopção de valores estimados deverá ser precedida da realização de análises de sensibilidade para testar a fiabilidade do ajustamento paramétrico.

Geralmente, os métodos de determinação das constantes cinéticas podem ser divididos em dois grupos, de acordo com o modo de cultura: cultura em reactor “batch” e cultura em contínuo, sendo o primeiro predominantemente usado, designadamente na obtenção de dados sobre biodegradabilidade de compostos orgânicos (Gates e Marlar, 1968, Simkins e Alexander, 1984, Simkins e Alexander, 1985, Braha e Hafner, 1987, Lewandowski, 1990, Ellis *et al.*, 1986).





## 2. Objectivos

O presente trabalho teve por objectivo contribuir para o estudo da cinética de degradação de um substrato orgânico em biofilmes de espessura controlada, ou seja, constante no tempo, obtidos com um dispositivo experimental especialmente concebido para produzir biofilmes de determinada espessura. Utilizando-se o tempo como medida indirecta deste parâmetro, introduziu-se o conceito de “idade do biofilme ( $t_m$ )”, entendido como o tempo máximo ( $t_m$ ) que a biomassa se encontra fixa a um suporte, normalmente definido por um intervalo ( $t_m - \varepsilon$ ;  $t_m$ ), sendo  $\varepsilon$ , tal como  $t_m$ , valores de tempo previamente adoptados.

Apesar dos inúmeros trabalhos já realizados sobre biofilmes, considera-se inovadora a abordagem adoptada, na medida em que esses trabalhos foram realizados com biofilmes em crescimento contínuo.

De modo complementar, o trabalho incorporou o desenvolvimento de um método “on-line” não destrutivo para determinar a espessura do biofilme, baseado na capacidade eléctrica.

Assim, para prossecução do objectivo principal do trabalho, adoptaram-se os seguintes objectivos específicos:

- estudo da cinética de degradação de um substrato orgânico utilizando biofilmes de diferentes idades;
- desenvolvimento de um método de medição da espessura do biofilme;
- análise da estrutura do biofilme através de microscopia electrónica.



### 3. Plano Experimental

#### 3.1. Descrição geral

Para satisfação dos objectivos a que o presente trabalho se propôs, foi fixado um Plano Experimental que comportou quatro Fases, como a seguir se indica (Quadro 2).

Quadro 2 – Resumo do Plano Experimental

Fase	Objectivo	Descrição sumária
0	Estudos preparatórios necessários à execução das fases seguintes	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Estudo de um biofilme com espessura (e idade) crescente (processo normal de crescimento de um biofilme), utilizando duas concentrações de substrato: 500 e 1000 mg/l - CQO</li> <li>- Verificação da eventual existência de adsorção do substrato ao meio de suporte</li> </ul>
1	Desenvolvimento de um método de medição da espessura do biofilme	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Estudo da relação entre a espessura do biofilme e a variação da capacidade eléctrica entre duas placas paralelas dispostas a igual distância do biofilme</li> <li>- Estudo da melhor frequência para medir a variação da capacidade eléctrica em função da espessura do biofilme</li> </ul>
2	Estudo da cinética de degradação de um substrato orgânico (concentração média*) através de biofilmes de espessura constante	- Estudo da degradação de um substrato orgânico a uma concentração de 500 mgO <sub>2</sub> /l - CQO, através de biofilmes com idades compreendidas entre 0,5 e 6 dias
3	Estudo da cinética de degradação de um substrato orgânico (concentração alta*) através de biofilmes de espessura constante	- Estudo da degradação de um substrato orgânico a uma concentração de 1000mgO <sub>2</sub> /l - CQO, através de biofilmes com idades compreendidas entre 0,5 e 6 dias

\* - Caracterização indicativa do teor de matéria orgânica do substrato, relativamente a uma água residual doméstica

No Quadro 3, indicam-se os ensaios correspondentes à Fase 1

Quadro 3 – Plano Experimental (Fase 1)

Ensaio	Caudal (l/h)	S <sub>0</sub> (mgO <sub>2</sub> /l)	Frequência (KHz)
1.1	0,5	500	1
1.2	0,5	500	10
1.3	0,5	500	100

S<sub>0</sub> – Concentração de substrato na alimentação do reaktor, medida em CQO.

No Quadro 4, indicam-se os ensaios correspondentes às Fases 2 e 3

Quadro 4 – Plano Experimental (Fases 2 e 3)

FASE EXPERIMENTAL							
FASE 2				FASE 3			
Ensaio	Id (d)	Caudal (l/h)	S <sub>0</sub> (mgO <sub>2</sub> /l)	Ensaio	Id (d)	Caudal (l/h)	S <sub>0</sub> (mgO <sub>2</sub> /l)
2.1	0,5 – 1	0,5	500	3.1	0,5 – 1	0,5	1000
2.2	1 – 2	0,5	500	3.2	1 – 2	0,5	1000
2.3	2 – 3	0,5	500	3.3	2 – 3	0,5	1000
2.4	3 – 4	0,5	500	3.4	3 – 4	0,5	1000
2.5	4 – 5	0,5	500	3.5	4 – 5	0,5	1000
2.6	5 – 6	0,5	500	3.6	5 – 6	0,5	1000

Id – Idade do biofilme; S<sub>0</sub> – Concentração de substrato na alimentação do reactor, medida em CQO;

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1. Materiais

#### 4.1.1. Substrato

O substrato utilizado foi adaptado de Santana, F. (1986) e consistiu em leite em pó desnatado (Molico – Nestlé) diluído para se obterem concentrações de CQO de 500 e 1000 mgO<sub>2</sub>/l.

No Quadro 5, indicam-se as características principais do substrato utilizado, constatando-se que satisfazem os requisitos básicos de nutrientes, sendo a relação de CQO/N/P de 25/1/0,9 para ambas as concentrações (500 e 1000 mgO<sub>2</sub>/l).

Quadro 5 – Principais características do substrato

Parâmetro	S <sub>0</sub> (mgO <sub>2</sub> /l – CQO)	
	500	1000
pH	6,7	6,9
SST (mg/l)	32	38
CQO (mg O <sub>2</sub> /l)	500	1000
Azoto total (mg N /l)	20	40
Fósforo total (mg P /l)	18	36

As características indicadas para as soluções de alimentação correspondem, respectivamente, a uma diluição de 0,55 g e 1,2 g de leite em pó desnatado por litro de água.

#### 4.1.2. Dispositivos experimentais

##### 4.1.2.1. Para a obtenção de biofilmes de idade constante

No diagrama apresentado na Figura 4 mostra-se a instalação piloto utilizada para obtenção de biofilmes, constituída por reactores isolados de discos biológicos, que incluía:

a) Sistema de alimentação de substrato e de recolha de efluente, incorporando o seguinte equipamento:

- dois reservatórios de armazenamento da solução de alimentação com uma capacidade individual de 65 litros, instalados em dois frigoríficos, marca “*Sharp*”, (Japão);
- seis bombas peristálticas de débito variável, marca “*Watson – Marlow*” (Inglaterra), tipo 302S e 503S.

- dois reservatórios para recolha da descarga da instalação piloto com uma capacidade individual de 50 litros.

b) Reactores de discos biológicos

- número de reactores .....6
- volume unitário (l).....0,9
- número de discos / reactor (Teflon) .....4
- diâmetro dos discos (m).....0,12
- accionamento dos discos através de moto-reductor, marca “*Oriental Motor*” (Japão) 5IK60GS – CFE
- Velocidade de rotação dos discos (r.p.m.).....10

c) Controlo de temperatura aproximadamente a 20°C, por sistema de ar condicionado instalado na sala onde se encontrava a instalação piloto.

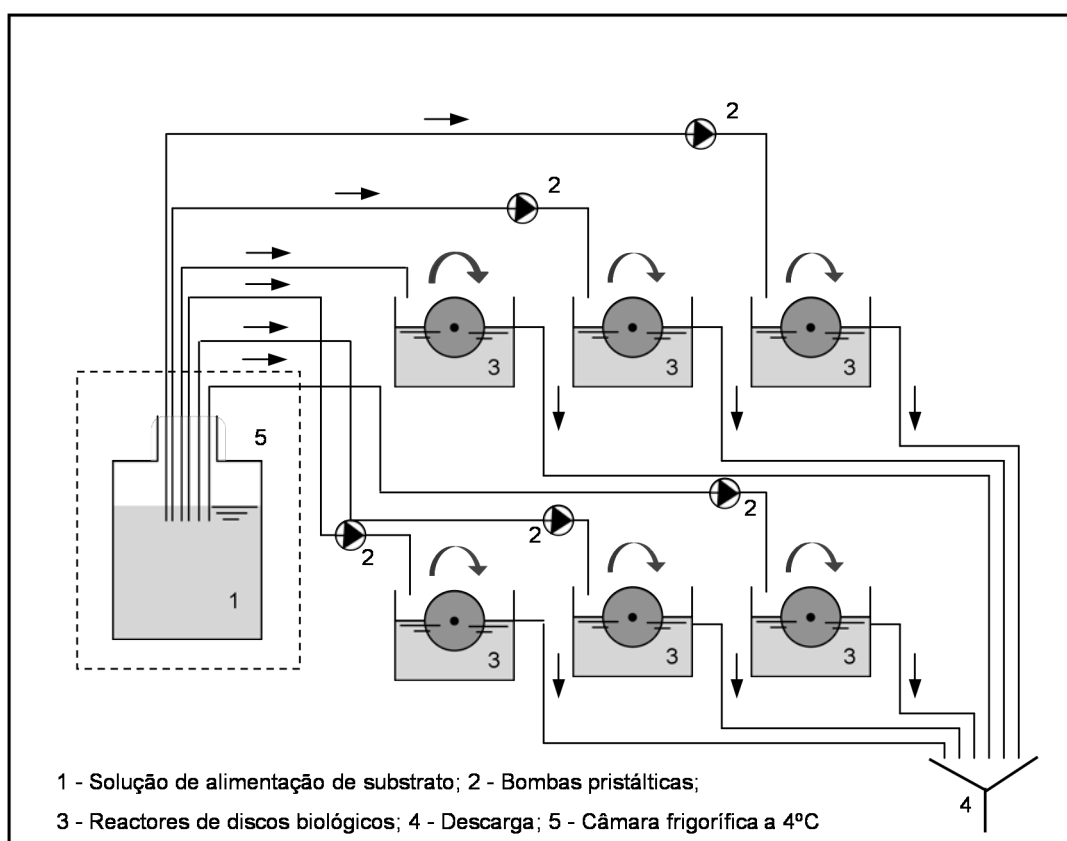


Figura 4 - Instalação piloto

Na Figura 5, mostram-se os vários sistemas constituintes da instalação piloto.



Figura 5 – Aspectos da Instalação Piloto (A – Vista geral; B – Sistema de alimentação; C – Dispositivo para medição da espessura de biofilme; D – Detalhe dos reactores de discos biológicos)

#### 4.1.2.2. Para medição da espessura do biofilme

A espessura do biofilme foi medida através de observação directa, utilizando um micrómetro com uma ampliação de 12 x, conforme se mostra na Figura 6.



Figura 6 – Micrómetro utilizado para medição da espessura de biofilme.

#### 4.1.2.3. Para medição da capacidade eléctrica

Na Figura 7 mostra-se o dispositivo experimental desenvolvido para medir a capacidade eléctrica “on-line”, de forma não invasiva para o biofilme.

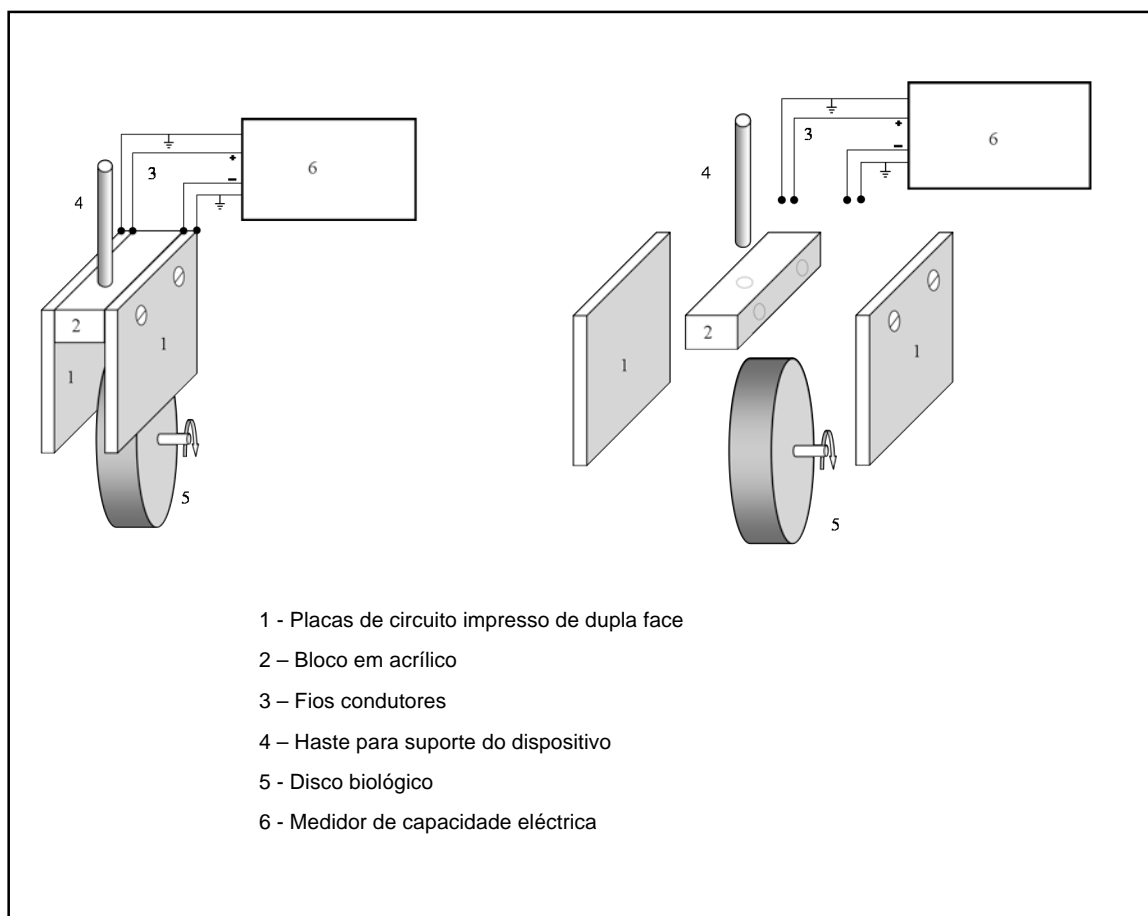


Figura 7 – Dispositivo experimental para medição da capacidade eléctrica

Para as várias experiências construiu-se um dispositivo de medição constituído por duas placas (1) espaçadas de 17mm, através de um bloco espaçador em acrílico (2). O comprimento e largura das placas era de 100 e 85 mm respectivamente, correspondendo por isso a uma área de 8500mm<sup>2</sup>. O dispositivo foi construído tendo em consideração que entre as placas ficaria colocado o disco rotativo (5), meio de suporte para o crescimento do biofilme, fixado através de uma haste (4) e de uma garra. Foi utilizada uma ponte “RLC QuadTech” (EUA), modelo 7600 (6), para medir a impedância, cuja gama de medição de capacidade variava de 1 pF a 10 µF, com frequência de excitação programável entre 10Hz e 2 MHz. A tensão aplicada entre as placas foi, em todas experiências, de 1 V.



#### 4.1.2.4. Para verificação de eventuais processos de adsorção de substrato ao meio de suporte

Com o objectivo de verificar se durante as primeiras horas de ensaio o fenómeno de adsorção de substrato ao meio de suporte era significativo, foram realizados ensaios isolando o ambiente envolvente do reactor, através de uma tampa, e aplicando um fluxo de azoto para substituição do ar, por forma a impedir a presença de oxigénio.

Durante o ensaio manteve-se a rotação dos discos, de modo a simular condições próximas das de realização dos ensaios principais deste estudo.

Na Figura 8 mostra-se a instalação construída para a realização dos testes de adsorção ao meio de suporte utilizado.

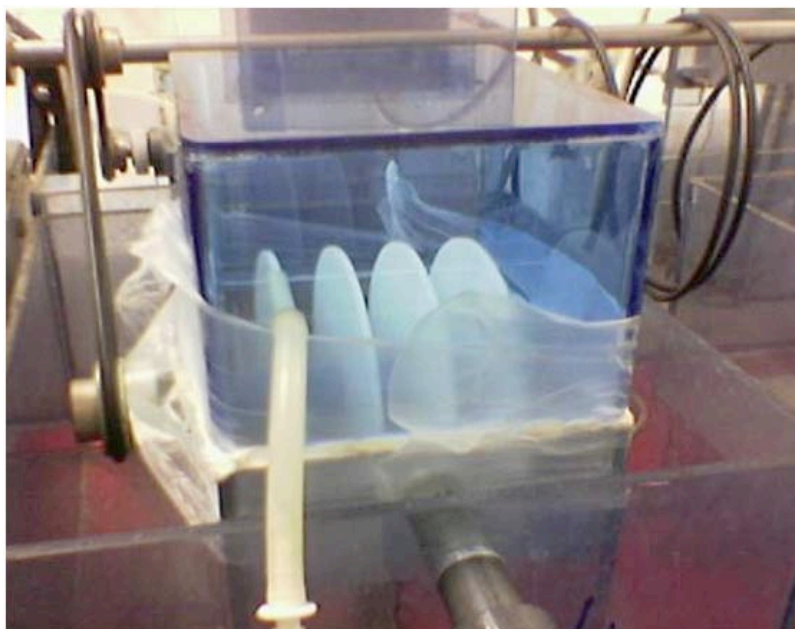


Figura 8 – Adaptação da instalação para ensaios de verificação de adsorção de substrato ao meio de suporte

## 4.2. Métodos

Todas as determinações analíticas foram realizadas de acordo com as técnicas descritas no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005). A fracção solúvel das amostras foi obtida por filtração através de filtros “*Whatman*” GF/C (EUA).

#### 4.2.1. Carbono Orgânico Total (DOC)

O carbono orgânico total foi determinado na fracção solúvel das amostras, através de um analisador de carbono total “TOC – 5000 A” da “Shimadzu” (Japão).

O equipamento usado mediu separadamente o carbono total (CT) e o carbono inorgânico (CI), tendo-se obtido o DOC por diferença daqueles valores.

Na determinação do carbono total, a amostra passava por um tubo de combustão, que continha o catalizador de oxidação, sendo o carbono convertido para CO<sub>2</sub>, o qual era seguidamente detectado, através de um analisador de infravermelhos não dispersivo (“NDIR Non – *Dispersive Infrared Gas Analyzer*”). O analisador emitia um sinal analógico que gerava uma variação, sendo a área sob a curva, calculada por um processador de dados, proporcional à concentração em carbono total da amostra.

Na determinação do carbono inorgânico, a amostra foi misturada com um reagente inorgânico (ácido fosfórico), sendo o carbono inorgânico decomposto e transformado em CO<sub>2</sub>, o qual era detectado através do “NDIR”, como referido.

#### 4.2.2. Carência Química de Oxigénio (CQO)

A determinação da CQO na fracção solúvel das amostras, foi efectuada pelo método colorimétrico de refluxo fechado.

A amostra foi mantida em refluxo a aproximadamente 150°C durante duas horas, em tubos de digestão fechados, numa mistura de ácido sulfúrico com nitrato de prata, à qual se adicionou dicromato de potássio em excesso. Para a digestão utilizou-se um aparelho marca “Vittadini Record/19”. Depois da digestão determinou-se o oxigénio consumido na oxidação da matéria orgânica da amostra, por espectrofotometria a 620nm, através de um aparelho marca “Hach DR/2000” (EUA). Os valores de absorvância registados foram então convertidos em CQO, através de uma curva de calibração  $CQO = f(\text{Absorvância})$

#### 4.2.3. Sólidos Suspensos Totais (SST), Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)

Para a análise dos SST e SSV foram utilizados filtros de papel “Whatman” GF/C (EUA) de 47mm de diâmetro. Os SST foram determinados filtrando a amostra e secando o resíduo retido no filtro, tarado a 103-105°C até peso constante, correspondendo o aumento de peso no filtro aos SST presentes no volume de amostra filtrado. Os SSV foram determinados por incineração, a  $500 \pm 50^\circ\text{C}$ , do papel de filtro usado para determinar os SST.

#### 4.2.4. pH

O pH foi determinado pelo método potenciométrico, utilizando um aparelho marca “*Orion*” (EUA), modelo SA 720.

#### 4.2.5. Oxigénio dissolvido

O Oxigénio dissolvido foi determinado através de um eléctrodo de oxigénio marca “*Orion*” (EUA), modelo 97-08.

#### 4.2.6. Capacidade eléctrica

O método de medição da capacidade eléctrica baseou-se na aplicação de uma diferença de potencial entre duas placas paralelas separadas por um material não condutor. A quantidade de carga em cada placa depende: (1) da diferença de potencial aplicada, (2) da separação de cargas que ocorre no interior do material entre eléctrodos e (3) de factores geométricos, tais como a área das placas, e da distância entre elas. A razão entre a tensão aplicada e a carga em cada uma das placas denomina-se capacidade eléctrica da camada isolante (Fraden, 1995).

A capacidade eléctrica ( $C$ ) medida entre duas placas paralelas à distância  $d$  e com superfície  $A$  (área das placas), é dada por,

$$C = \epsilon \epsilon_o \frac{A}{d} \quad (\text{eq. 21})$$

sendo  $\epsilon_o$  a permitividade do vazio (isto é  $8,854 \times 10^{12}$  F/m) e  $\epsilon$  a constante dieléctrica do meio (F/m).

Na Figura 9 mostra-se, esquematicamente, o princípio de determinação da capacidade eléctrica.

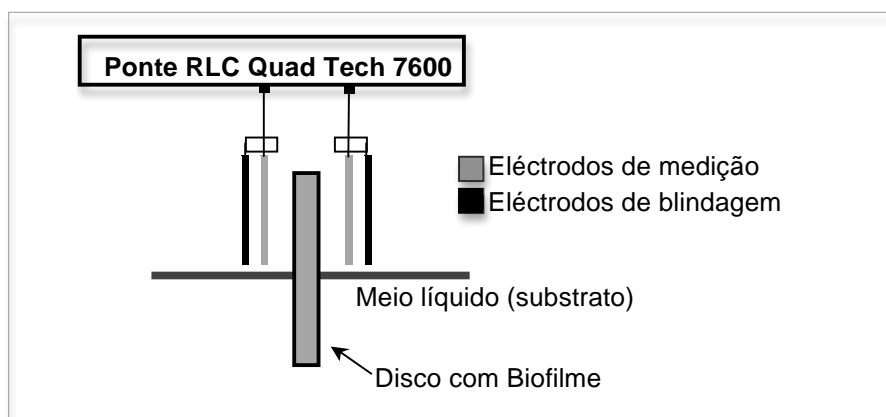


Figura 9 – Esquema do dispositivo construído para medição da capacidade eléctrica

Na Figura 10 mostra-se a instalação construída para a medição e registo da capacidade eléctrica.

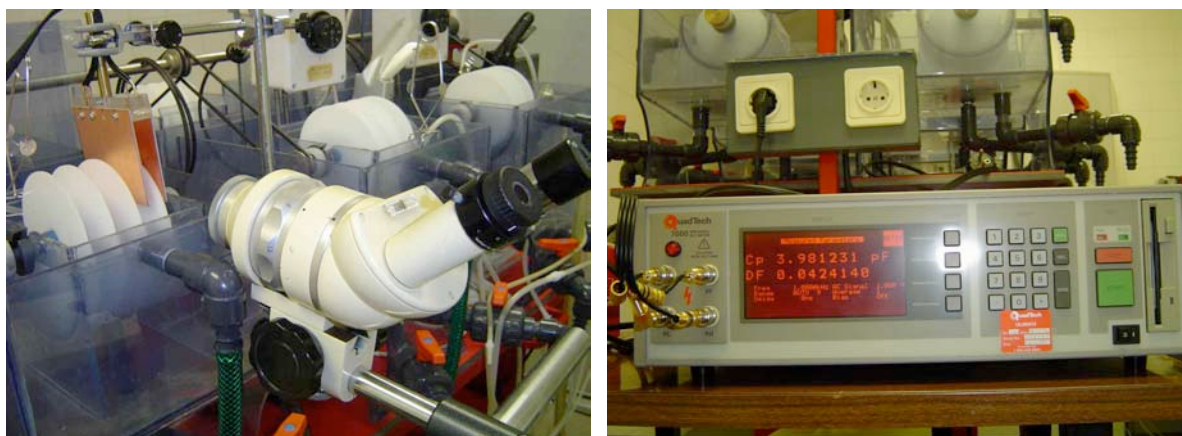


Figura 10 – Medição e registo da capacidade eléctrica e da espessura do biofilme. (A – Micrómetro; B – Medidor registador de capacidade eléctrica)

#### 4.2.7. Microscopia electrónica

A textura, e outras características, do biofilme foram observadas através de microscopia electrónica, utilizando um microscópio “Jeol” (Japão) T330A com uma *accelerating voltage* de 20 KVA.

As amostras de biofilme foram previamente revestidas a ouro e secas num evaporador “Polaron Equipment KDT”, durante dois minutos a 15000 A, formando uma película metalizada, que foi posteriormente cortada para subsequente observação.

### 4.3. Modo Operatório

#### Procedimento de base, comum a todas as fases

Para cada um dos ensaios, a exploração da instalação piloto utilizada para obtenção de biofilmes de espessura controlada incluiu as seguintes operações:

- preparação da solução de alimentação para os reservatórios de armazenamento, através de: diluição de leite em pó com água e verificação e, ou acerto de pH. Esta operação, foi realizada diariamente e a solução mantida a 4°C;
- verificação e controlo diários da temperatura do tanque de alimentação e da sala onde decorreram os ensaios;
- calibração dos débitos das bombas peristálticas, através de proveta graduada e cronómetro. Esta operação foi realizada diariamente;
- recolha de amostras da fase líquida de cada um dos reactores em ensaio (mínimo duas por dia);
- pré-tratamento e preservação das amostras recolhidas, incluindo filtração; adição de ácido sulfúrico concentrado, até pH = 4, e conservação em frigorífico a  $\approx 4^{\circ}\text{C}$ ;
- determinação da CQO e do DOC dos SST e dos SSV das amostras recolhidas diariamente;
- determinação diária do pH e do oxigénio dissolvido na fase líquida dos reactores;
- determinação e registo “on line” em suporte informático da capacidade eléctrica.

O ensaio considerou-se terminado logo que se observou o desprendimento do filme biológico fixado sobre os discos (ensaios contínuos). Nas restantes experiências os ensaios foram terminados quando a taxa de degradação do substrato estabilizava (aproximadamente 10 dias).

Após cada ensaio procedeu-se à manutenção de todo o material e equipamento, nomeadamente:

- lavagem com água de todo o sistema, isto é, dos reservatórios de armazenamento da solução de alimentação, das tubagens e dos reactores, efectuando-se previamente a raspagem do biofilme.

De modo a ter biofilmes com idade constante durante os ensaios incorporou-se um procedimento paralelo que permitiu desenvolver biofilmes com as características pretendidas.

Sendo o biofilme uma estrutura frágil, optou-se por transferir conteúdos do reactor (transferência do reactor em análise para o reactor com o biofilme de idade pretendida) e não o suporte com o biofilme, conforme se mostra nas Figuras 11, 12 e 13 e nos Quadros 1 e 2 do Anexo 1.

## **FASE 0**

### **Ensaio de degradação de um substrato orgânico num regime de crescimento da biomassa contínuo e não controlado (Ensaio Contínuo)**

#### **Ensaio Contínuo 1 e 2**

Nestes ensaios foi utilizada uma solução de alimentação com concentrações de CQO de 500 mgO<sub>2</sub>/l e 1000 mgO<sub>2</sub>/l. Foram realizadas experiências onde se analisou a taxa de degradação do substrato com um biofilme de espessura (e idade) crescente. O procedimento utilizado pretendeu simular a exploração deste tipo de sistemas nas estações de tratamento de águas residuais e obter informação para comparar as taxas de degradação registadas, do mesmo substrato, com as dos ensaios realizados durante as Fases 2 e 3.

#### **Ensaio de verificação da eventual existência de adsorção do substrato ao meio de suporte**

Para o ensaio de verificação de eventuais processos de adsorção ao meio de suporte construiu-se um dispositivo experimental conforme se mostrou no ponto 4.1.2.4. que permitiu isolar o reactor e o ambiente envolvente, através de uma tampa e de um fluxo de azoto (para que a pressão dentro do reactor não permitisse a entrada de ar e, consequentemente, de oxigénio). Estes ensaios foram realizados para as duas concentrações de solução de alimentação anteriormente referidas, isto é, concentrações de CQO de 500 mgO<sub>2</sub>/l e 1000 mgO<sub>2</sub>/l, de modo a poder controlar as condições de ensaio utilizadas durante as Fases 2 e 3.

Com efeito, o fenómeno de adsorção ao meio de suporte poderia falsear resultados tidos como de degradação do substrato, uma vez que a concentração à saída do reactor diminuiria, fazendo pressupor uma degradação que não teria ocorrido. Desta forma, foram analisadas as concentrações do efluente à saída do reactor ao longo do tempo, observando procedimentos específicos, nomeadamente:

- Solução de alimentação autoclavada, de forma a eliminar microrganismos presentes, potenciadores de crescimento biológico no suporte;
- Reactor estanque e meio de suporte previamente esterilizado;
- Aplicação de um fluxo de azoto na atmosfera confinada do reactor, de forma a manter uma pressão positiva, para evitar a entrada de ar e, consequentemente, de oxigénio potenciador de crescimento biológico no meio de suporte.

## **FASE 1**

### **Ensaio de calibração e correlação entre a espessura do biofilme e a correspondente capacidade eléctrica**

Foram realizados vários ensaios onde se analisou a correlação entre os valores da espessura do biofilme e da respectiva capacidade eléctrica. Estes ensaios permitiram o desenvolvimento de um método indirecto, “on-line” e não destrutivo da espessura do biofilme. Para a realização destes ensaios foi construído um dispositivo próprio conforme se descreveu no ponto 4.1.2.3.

Foram ainda realizados ensaios de calibração da frequência de medição da capacidade eléctrica, nomeadamente medições a 1 kHz, 10 kHz e 100 kHz com o objectivo de procurar identificar qual a frequência mais adequada para a realização desta medição.

A solução de alimentação utilizada nestes ensaios foi de 500 mgO<sub>2</sub>/l – CQO.

## **FASE 2**

Foram realizados seis ensaios, utilizando uma concentração de substrato na alimentação do reactor aproximadamente constante (500 mgO<sub>2</sub>/l – CQO) e seis intervalos diferentes de idade de biofilme.

Esta fase experimental teve por objectivo determinar um conjunto de situações de funcionamento dos reactores em regime contínuo mantendo constante no tempo (para cada ensaio) a idade do biofilme. Esta fase teve ainda como objectivo a determinação das taxas de degradação de um substrato orgânico para diferentes idades de biofilme.

## **FASE 3**

Foram realizados seis ensaios, utilizando uma concentração de substrato na alimentação do reactor aproximadamente constante (1000 mgO<sub>2</sub>/l – CQO) e seis intervalos diferentes de idade de biofilme.

Esta fase experimental teve por objectivo determinar um conjunto de situações de funcionamento dos reactores em regime contínuo mantendo constante no tempo (para cada ensaio) a idade do biofilme. Esta fase teve ainda como objectivos a determinação das taxas de degradação de um substrato orgânico para diferentes idades de biofilme e verificar a influência para aquelas taxas da variação da concentração de alimentação dos reactores.

Com os diagramas das Figuras 11, 12 e 13 exemplifica-se o modo operatório para obtenção de biofilmes com idades compreendidas entre 0,5 e 1 dia, 3 e 4 dias e 5 e 6 dias.

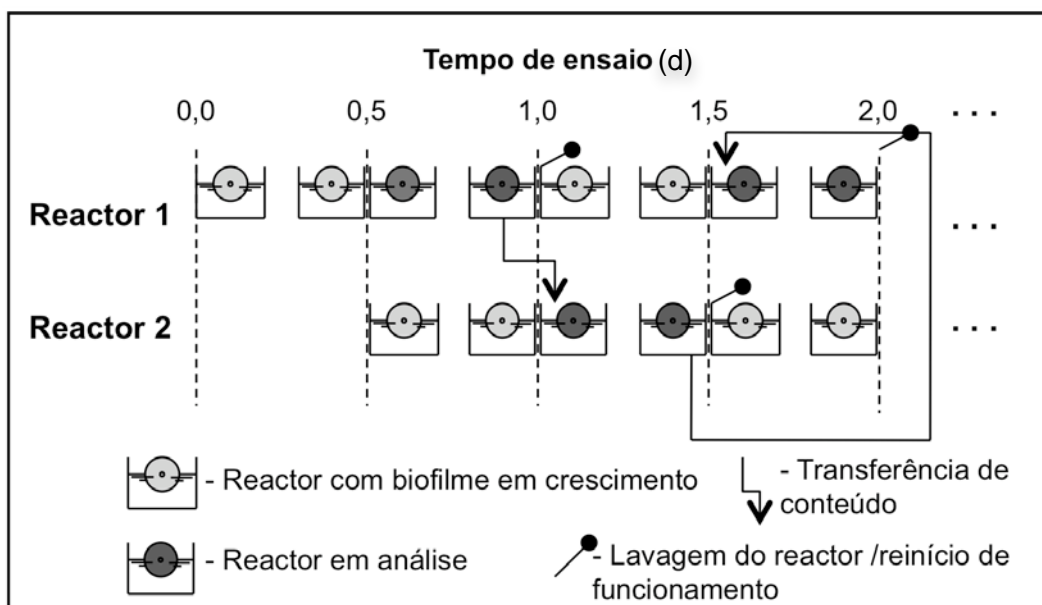


Figura 11 - Exemplificação do modo operatório para obtenção de biofilmes com idades compreendidas entre 0,5 e 1 dia

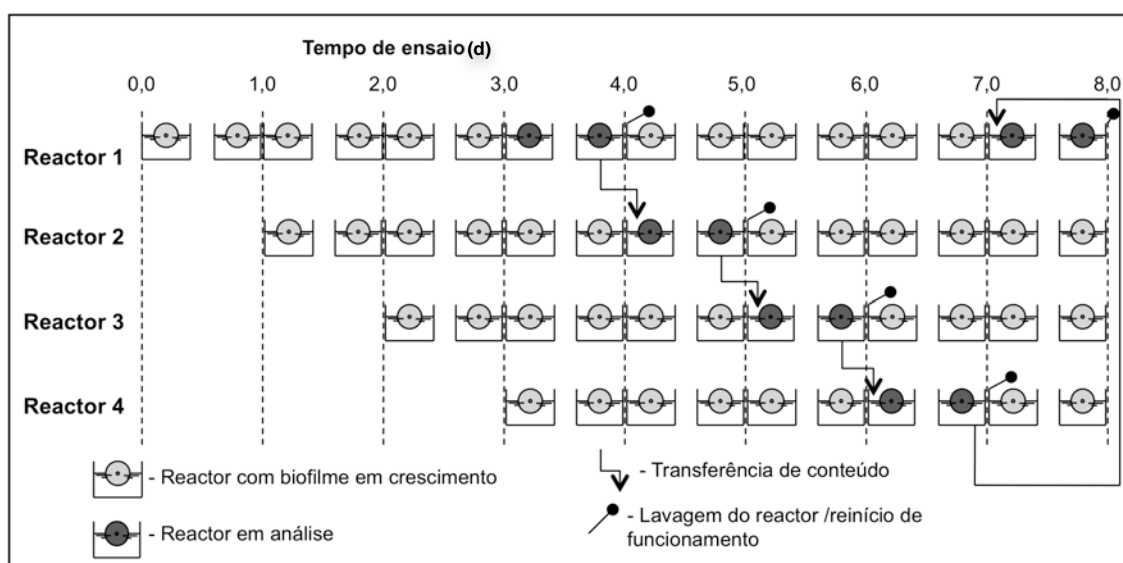


Figura 12 - Exemplificação do modo operatório para obtenção de biofilmes com idades compreendidas entre 3 e 4 dias



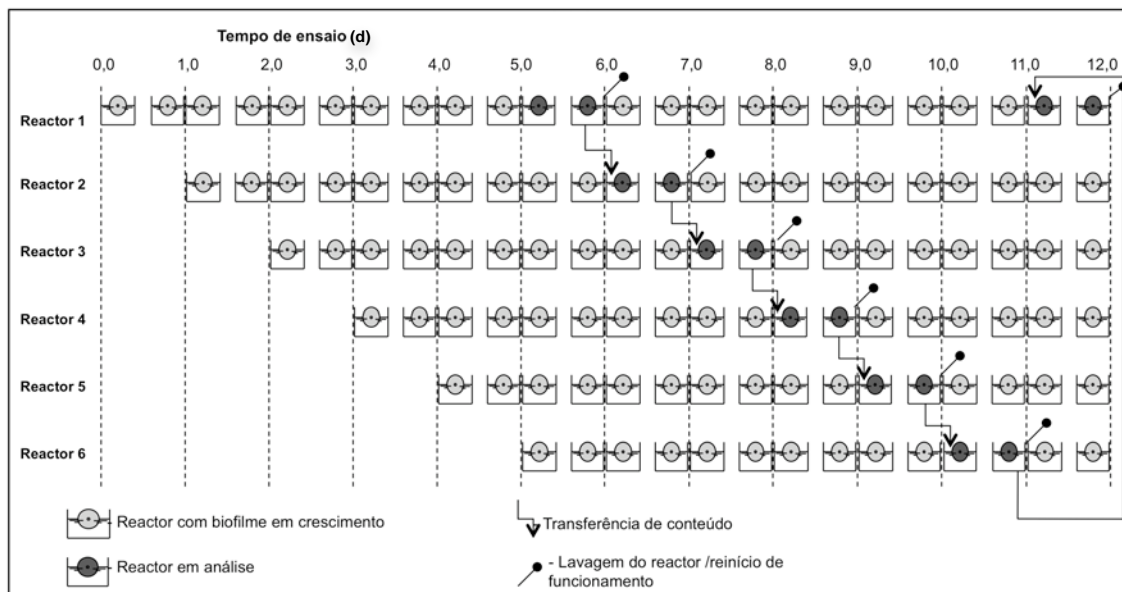


Figura 13 - Exemplificação do modo operativo para obtenção de biofilmes com idades compreendidas entre 5 e 6 dias



## 5. Resultados

### 5.1. Introdução

Em cada experiência considerou-se atingida a situação de eficiência próxima do regime estacionário (\*) no período em que se verificava a estabilização dos valores da concentração do substrato da fase líquida, como se exemplifica na Figura 14.

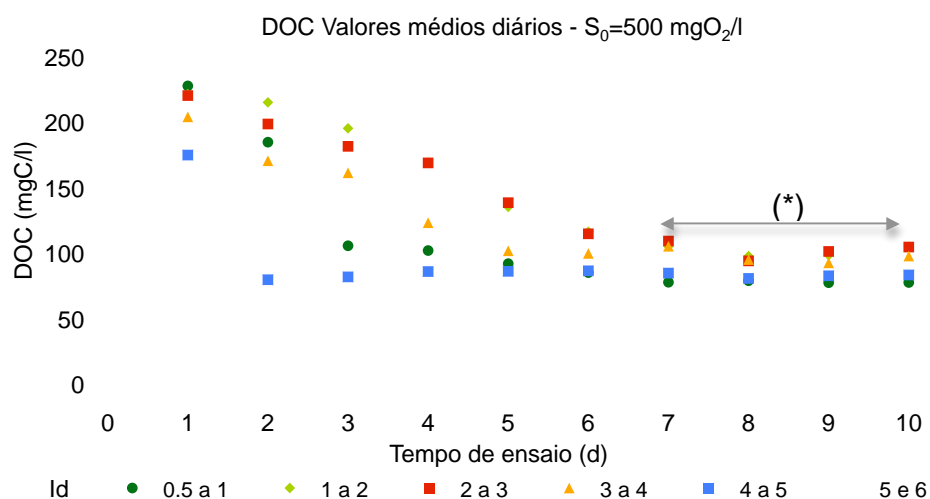


Figura 14 – Exemplo da evolução da concentração de substrato num reactor

Para facilidade de análise dos resultados, nos Quadros 6 e 7 reproduzem-se as principais condições das fases experimentais e a notação utilizada nos diferentes ensaios.

Quadro 6 – Principais Condições das Fases Experimentais

Fase Experimental	Caudal (l/h)	$S_0$ (mgO <sub>2</sub> /l) – CQO
0	0,5	500 e 1000
1	0,5	500
2	0,5	500
3	0,5	1000

Quadro 7 – Notação utilizada nos diferentes ensaios

Idade do biofilme	Notação
Idade entre 0,5 e 1 (dias)	Id 0,5 a 1
Idade entre 1 e 2 (dias)	Id 1 a 2
Idade entre 2 e 3 (dias)	Id 2 a 3
Idade entre 3 e 4 (dias)	Id 3 a 4
Idade entre 4 e 5 (dias)	Id 4 a 5
Idade entre 5 e 6 (dias)	Id 5 a 6
Média diária	md

## 5.2. Resultados da Fase 0

Nos Quadros 8 e 9 indicam-se os resultados obtidos durante os ensaios de crescimento contínuo de biofilme para as duas concentrações da solução de alimentação utilizadas (500 e 1000mgO<sub>2</sub>/l – CQO), calculando-se a variação dos fluxos mássicos, quantidade de substrato degradado por unidade de área, ou de volume, de biofilme na unidade de tempo. Os fluxos mássicos, por unidade de área e por unidade de volume, foram calculados através das seguintes expressões, respectivamente:

$$\text{Fluxo mássico}_{\text{área}} = Q (S_0 - S_1)/A$$

$$\text{Fluxo mássico}_{\text{volume}} = Q (S_0 - S_1)/V$$

Sendo: Q – Caudal (m<sup>3</sup>/h); A – Área de biofilme (m<sup>2</sup>) ; V – Volume de biofilme (m<sup>3</sup>). O volume de biofilme foi calculado multiplicando a área de biofilme pela respectiva espessura, considerada constante e igual à espessura da maior das idades de biofilme para cada intervalo analisado.

Quadro 8 – Ensaio Contínuo – S<sub>0</sub> = 500mgO<sub>2</sub>/l – CQO

Tempo, d	S <sub>1</sub> , md		Fluxo mássico <sub>área</sub>		Fluxo mássico <sub>volume</sub>	
	DOC (mgC/l)	CQO (mgO <sub>2</sub> /l)	(gDOC/m <sup>2</sup> .h)	(gCQO/m <sup>2</sup> .h)	(gDOC/m <sup>3</sup> .h)	(gCQO/m <sup>3</sup> .h)
1	230	502	0,00	0,03	1,52	159,34
2	214	431	0,09	0,43	198,33	944,78
3	187	336	0,24	0,95	398,35	1584,95
4	174	250	0,31	1,43	342,01	1584,69
5	170	193	0,33	1,74	277,23	1449,40
6	166	173	0,35	1,85	159,88	841,70
7	161	151	0,38	1,97	173,32	896,46
8	142	128	0,48	2,10	220,04	953,98
9	111	114	0,66	2,18	298,54	989,40
10	107	110	0,68	2,20	309,97	998,57

Quadro 9 – Ensaio Contínuo – S<sub>0</sub> = 1000mgO<sub>2</sub>/l – CQO

Tempo, d	S <sub>1</sub> , md		Fluxo mássico <sub>área</sub>		Fluxo mássico <sub>volume</sub>	
	DOC (mgC/l)	CQO (mgO <sub>2</sub> /l)	(gDOC/m <sup>2</sup> .h)	(gCQO/m <sup>2</sup> .h)	(gDOC/m <sup>3</sup> .h)	(gCQO/m <sup>3</sup> .h)
1	496	903	0,08	0,54	395,82	2693,94
2	391	578	0,66	2,33	1318,55	4669,39
3	247	432	1,45	3,14	1612,12	3494,20
4	171	313	1,87	3,80	1702,58	3456,23
5	157	270	1,95	4,04	886,83	1834,49
6	136	245	2,07	4,18	516,70	1044,48
7	126	221	2,12	4,31	530,31	1077,22
8	124	197	2,13	4,44	532,93	1110,58
9	124	183	2,13	4,52	533,21	1129,51
10	124	180	2,13	4,54	533,49	1134,28

Nas Figuras 15 e 16 mostra-se a variação da concentração de CQO do substrato no reactor, e nas Figuras 17 e 18 os resultados expressos em DOC, obtidos nos ensaios contínuos para concentrações de substrato de 500mgO<sub>2</sub>/l – CQO e 1000mgO<sub>2</sub>/l – CQO, respectivamente.

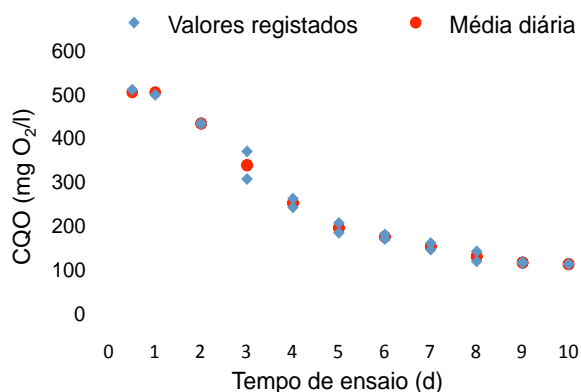


Figura 15 - Ensaio Contínuo com S<sub>0</sub> de 500mgO<sub>2</sub>/l – CQO. Valores registados em CQO

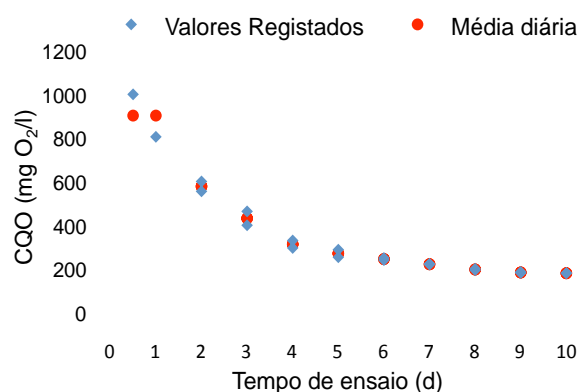


Figura 16 - Ensaio Contínuo com S<sub>0</sub> de 1000mgO<sub>2</sub>/l – CQO. Valores registados em CQO

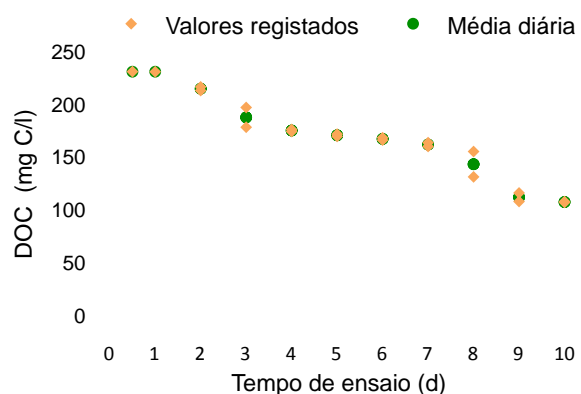


Figura 17 – Ensaio continuo com S<sub>0</sub> de 500mgO<sub>2</sub>/l – CQO. Valores registados em DOC

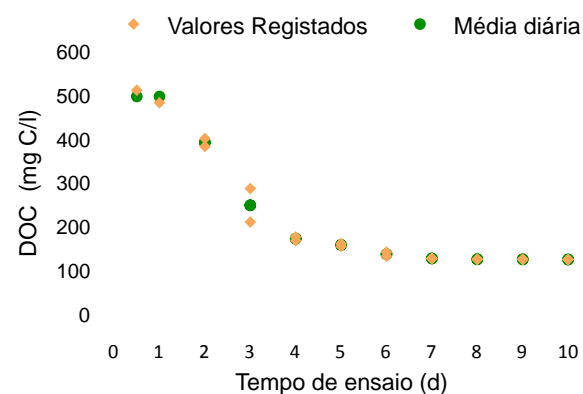


Figura 18 - Ensaio continuo com S<sub>0</sub> de 1000mgO<sub>2</sub>/l – CQO. Valores registados em DOC

Durante a Fase 0 foram realizados ensaios de verificação de eventuais processos de adsorção ao meio de suporte, tendo-se obtido os resultados apresentados nos Quadros 10 e 11 (alimentação a 500mg/l - CQO e a 1000mg/l – CQO). As medições foram efectuadas analisando o carbono total (CT) e carbono inorgânico (CI).

Os valores de CT das soluções de alimentação para uma concentração de 500mg/l – CQO e de 1000mg/l – CQO foram de 236 mgC/l e 517 mgC/l, respectivamente. Os valores de CI foram de 1,09 mg C/l e 1,06 mg C/l para as referidas concentrações de alimentação.

Quadro 10 – Resultados do ensaio de verificação da existência de adsorção ao meio de suporte – Concentração da solução de alimentação de 500mgO<sub>2</sub>/l – CQO

Tempo de Ensaio (min)	CT (mgC/l)	CI (mgC/l)
0	234	0,99
	238	1,20
15	232	0,95
	234	1,14
30	235	1,20
	236	0,94
45	235	1,34
	233	0,98
60	235	1,23
	233	0,86
120	235	1,04
	236	1,12
180	234	1,16
	237	1,16
240	235	1,21
	238	1,20
300	237	1,23
	238	1,20
360	237	1,10
	236	1,18

Quadro 11 – Resultados do ensaio de verificação da existência de adsorção ao meio de suporte – Concentração da solução de alimentação de 1000mg O<sub>2</sub>/l –CQO

Tempo de Ensaio (min)	CT (mgC/l)	CI (mgC/l)
0	516	0,90
	518	1,22
15	517	1,05
	518	1,12
30	516	1,29
	517	0,95
45	515	1,30
	518	0,99
60	517	1,23
	515	1,36
120	516	1,01
	517	1,00
180	517	1,11
	518	0,90
240	516	1,21
	516	1,23
300	518	0,90
	517	1,20
360	516	0,91
	517	1,22

Nas Figuras 19 e 20 mostram-se os valores médios de carbono total (CT) registados no reactor, para as duas concentrações de alimentação utilizadas.

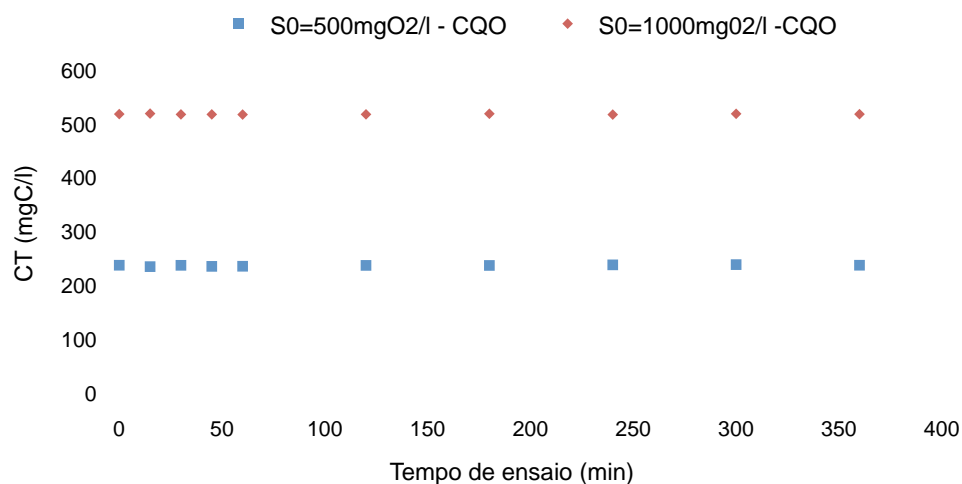


Figura 19 - Valores médios de CT no reactor.

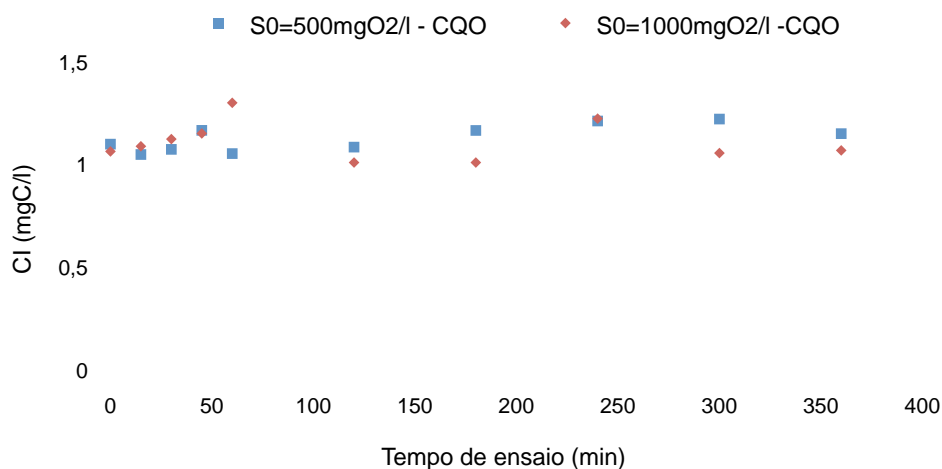


Figura 20 - Valores médios de CI no reactor

Apesar das ligeiras variações detectadas nos valores de CI, os resultados obtidos para qualquer das concentrações utilizadas mostram que a adsorção de substrato ao meio de suporte terá sido muito pouco significativa, o que deverá permitir validar os resultados obtidos para idades de biofilme entre 0,5 e 1 dia, confirmando que a redução de substrato no reactor que foi observada deverá efectivamente resultar de degradação biológica.

### 5.3. Resultados da Fase 1

No Quadro 12 e na Figura 21 mostram-se os resultados que relacionam a espessura do biofilme (mm) e os valores de capacidade eléctrica (pF) para as frequências estudadas.

Quadro 12 – Espessura do biofilme e capacidade eléctrica a diferentes frequências

Espessura (mm)	Capacidade eléctrica (pF)		
	Frequência (1 KHz)	Frequência (10 KHz)	Frequência (100 KHz)
0,0	3,674	3,934	4,338
0,0	3,673	3,933	4,338
0,2	3,660	3,920	4,328
0,4	3,590	3,900	4,264
0,4	3,588	3,900	4,167
0,5	3,547	3,879	4,160
0,5	3,520	3,860	4,148
0,6	3,510	3,851	4,140
0,7	3,493	3,818	4,088
0,7	3,488	3,821	4,078
0,9	3,478	3,787	4,058
1,4	3,430	3,790	4,053
1,4	3,420	3,719	4,040
1,5	3,399	3,739	4,035
1,6	3,353	3,659	4,020
1,7	3,335	3,647	4,016
1,8	3,310	3,606	3,999
1,8	3,307	3,583	3,986
2,0	3,192	3,438	3,850
2,1	3,166	3,438	3,843

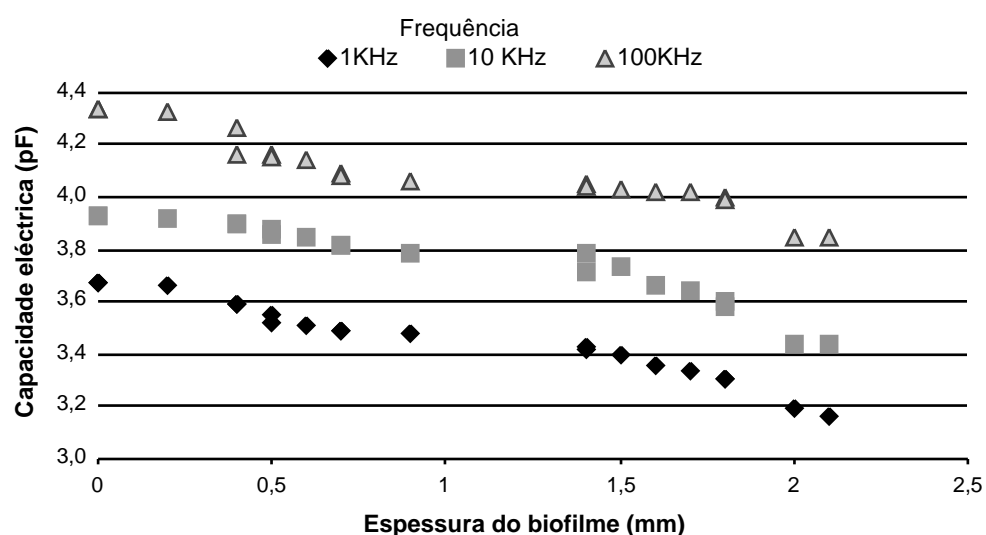


Figura 21 – Evolução da capacidade eléctrica do biofilme a diferentes frequências



Na Figura 22, indicam-se os resultados obtidos da variação no tempo da capacidade eléctrica (pF), para uma frequência de 1kHz, com a espessura do biofilme (mm).

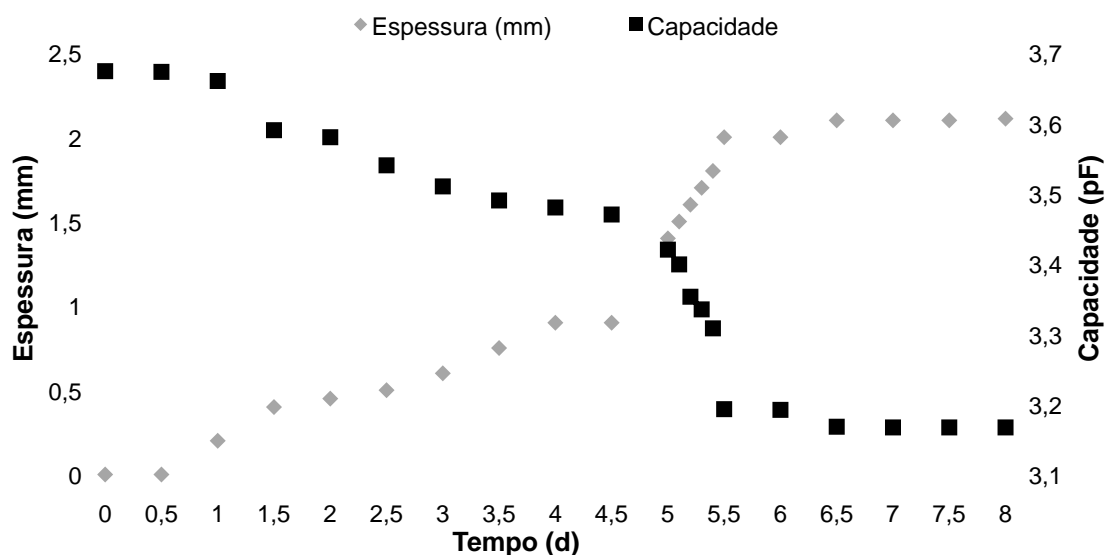


Figura 22 – Variação da capacidade eléctrica com a espessura do biofilme.

Para o estudo das características dos biofilmes foram desenvolvidos inúmeros métodos de análise, qualitativos e quantitativos, muitos dos quais invasivos e implicando a remoção do biofilme do suporte para permitir a determinação da respectiva espessura, da biomassa total, da actividade e da composição microbiológica. Para além disso, esses métodos requerem grandes quantidades de biofilme para que a amostra seja representativa (Gjaltema e Griebel, 1995).

Por outro lado, existem vários métodos “on-line” que, embora sendo não invasivos, têm algumas limitações, decorrentes de não serem aplicados nos reactores onde se encontram os biofilmes, o que os torna, por vezes, incompatíveis com algumas aplicações (Gjaltema e Griebel, 1995).

Apesar da espessura do biofilme constituir um dos parâmetros determinantes da eficiência de reactores de biomassa fixa (Gibbs e Bishop, 1995), como os discos biológicos ou os leitos percoladores, o seu controlo não é normalmente efectuado, quer devido a dificuldades inerentes à sua materialização, quer porque é assumido que a espessura se autocontrola naturalmente.

Verificou-se que, e como era de esperar, a espessura do biofilme aumentou ao longo do tempo, devido ao crescimento da biomassa, tendo este crescimento sido mais acentuado entre o 4,5º e 6º dias de ensaio, o que foi acompanhado por uma redução da a capacidade eléctrica.

Na Figura 23, mostra-se que é significativa a correlação entre a capacidade eléctrica (pF) e a espessura do biofilme (mm), a uma frequência de 1kHz, o que indicia o potencial de aplicação do método desenvolvido. De facto, com a regressão linear aplicada àqueles dados obteve-se um coeficiente de correlação de 0,9495. Dos valores da regressão concluiu-se também, que a sensibilidade deste tipo de medição foi de -0,2065 pF/mm, sendo negativa devido ao facto da capacidade diminuir quando a espessura aumenta.

Contudo, para que as medições sejam representativas, há que ter em consideração dois aspectos: (i) a precisão do instrumento de medição, isto é, a ponte de RLC deve permitir obter centésimas de picofarads e (ii) eliminação, quanto possível, de todas as fontes de ruído que possam afectar a medição. Em relação ao primeiro aspecto verificou-se que a ponte RLC da “QuadTech” utilizada permitiu efectuar medidas de capacidade com o grau de precisão adequado, isto é ao nível das centésimas de picofarads. Em relação ao segundo aspecto foram recolhidas cerca de 500 medições (num período relativamente curto, cerca de 10 minutos), com as quais foi calculada a respectiva média, valor que se assumiu como sendo da capacidade eléctrica real, sendo dessa forma atenuado o efeito negativo de eventuais fontes de ruído presentes.

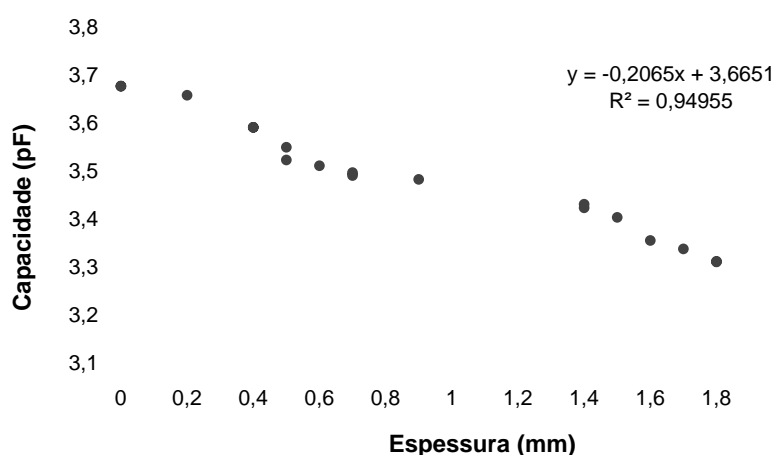


Figura 23 – Correlação entre a espessura e a capacidade eléctrica do biofilme

Contrariamente ao que seria de esperar, a capacidade eléctrica não variou directamente com o aumento da espessura de biofilme. Na verdade, e pela expressão numérica da capacidade eléctrica, verifica-se que a capacidade de um determinado meio é proporcional à sua constante dieléctrica. Como em geral todos os meios sólidos têm uma permissividade superior à de um gás e, no caso presente, o crescimento do biofilme corresponde efectivamente à substituição de um meio gasoso (i.e. o ar) por um meio sólido(ou líquido) seria de esperar, um aumento da capacidade eléctrica com o aumento da espessura do biofilme (Maurício *et. al.*, 2006).

Efectuaram-se duas outras experiências com os objectivos de (i) compreensão da diminuição da capacidade eléctrica com o aumento da espessura do biofilme e (ii) verificar se haveria, eventualmente, uma outra frequência de medição da capacidade eléctrica que fosse mais adequada do que a de 1 kHz, conforme se mostrou no Quadro 12 e na Figura 21. Concluiu-se que o comportamento dos valores de capacidade eléctrica para estas três frequências testadas não era substancialmente diferente. Por outro lado, constatou-se que a diminuição da capacidade eléctrica com o aumento da espessura do biofilme também se verifica a diferentes frequências (1 kHz, 10 kHz e 100 kHz). No entanto, a melhor correlação foi obtida com a frequência de 1 kHz (Maurício *et. al.*, 2006).

Uma possível explicação para a diminuição da capacidade eléctrica com o aumento da espessura do biofilme, tendo em conta as propriedades do meio aquoso, poderá basear-se no seguinte mecanismo. Quando, no início, não existe biofilme e, essencialmente, apenas ar, o campo eléctrico está mais ou menos uniformemente distribuído no espaço inter-eléctrodos. No entanto, quando o biofilme começa a crescer e a desenvolver-se, e devido às propriedades do meio que tem uma concentração iónica elevada, o campo eléctrico deixa de se distribuir uniformemente pelo espaço para se concentrar essencialmente na polarização das espécies iónicas num efeito denominado de blindagem.

Este efeito é tanto maior quanto maior for o número de espécies iónicas e a espessura do biofilme levando à diminuição do valor da capacidade eléctrica (Maurício *et. al.*, 2006).

## 5.4. Resultados da Fase 2

### Apresentação de resultados

Nos Quadros 13 a 18 indicam-se os resultados obtidos durante a Fase 2 de ensaios, bem como os fluxos mássicos por unidade de área e de volume do biofilme.

Todos os valores registados são indicados no Anexo 2.

Quadro 13 – Fase 2 – Id 0,5 a 1

Tempo, d	S <sub>1</sub> , md		Fluxo mássico <small>área</small>		Fluxo mássico <small>volume</small>	
	DOC (mgC/l)	CQO (mgO <sub>2</sub> /l)	(gDOC/m <sup>2</sup> .h)	(gCQO/m <sup>2</sup> .h)	(gDOC/m <sup>3</sup> .h)	(gCQO/m <sup>3</sup> .h)
1	227	494	0,00	0,02	1,38	99,01
2	184	383	0,07	0,37	341,24	1855,89
3	105	199	0,65	1,39	3254,94	6944,61
4	102	152	0,68	1,97	3406,91	9868,90
5	92	147	0,74	1,96	3710,44	9792,91
6	85	120	0,78	2,07	3916,57	10373,16
7	78	110	0,85	2,19	4257,39	10960,32
8	79	87	0,88	2,30	4388,09	11478,41
9	77	82	0,81	2,35	4072,82	11731,69
10	77	82	0,85	2,35	4264,72	11766,23

Quadro 14 – Fase 2 – Id 1 a 2

Tempo, d	S <sub>1</sub> , md		Fluxo mássico <small>área</small>		Fluxo mássico <small>volume</small>	
	DOC (mgC/l)	CQO (mgO <sub>2</sub> /l)	(gDOC/m <sup>2</sup> .h)	(gCQO/m <sup>2</sup> .h)	(gDOC/m <sup>3</sup> .h)	(gCQO/m <sup>3</sup> .h)
1	221	469	0,05	0,21	109,91	473,84
2	215	293	0,08	1,18	186,66	2633,14
3	195	262	0,19	1,36	429,82	3022,02
4	169	221	0,34	1,59	752,18	3526,54
5	135	180	0,52	1,81	1166,03	4028,51
6	116	178	0,63	1,83	1399,36	4055,63
7	105	127	0,69	2,10	1536,16	4676,30
8	98	117	0,73	2,16	1627,16	4802,69
9	98	115	0,73	2,17	1619,18	4829,81
10	105	108	0,69	2,21	1539,36	4910,14

Quadro 15 – Fase 2 – Id 2 a 3

Tempo, d	S <sub>1</sub> , md		Fluxo mássico <small>área</small>		Fluxo mássico <small>volume</small>	
	DOC (mgC/l)	CQO (mgO <sub>2</sub> /l)	(gDOC/m <sup>2</sup> .h)	(gCQO/m <sup>2</sup> .h)	(gDOC/m <sup>3</sup> .h)	(gCQO/m <sup>3</sup> .h)
1	220	446	0,06	0,34	92,10	570,27
2	198	302	0,18	1,14	291,97	1892,73
3	181	259	0,27	1,38	449,00	2291,84
4	169	171	0,34	1,86	565,52	3105,42
5	138	169	0,51	1,87	845,05	3120,78
6	115	171	0,64	1,86	1063,80	3105,42
7	109	162	0,67	1,91	1114,73	3182,18
8	94	117	0,75	2,16	1254,22	3604,32
9	101	97	0,71	2,27	1187,86	3780,85
10	104	99	0,69	2,26	1156,73	3765,50

Quadro 16 – Fase 2 – Id 3 a 4

Tempo, d	S <sub>1</sub> , md		Fluxo mássico <sub>área</sub>		Fluxo mássico <sub>volume</sub>	
	DOC (mgC/l)	CQO (mgO <sub>2</sub> /l)	(gDOC/m <sup>2</sup> .h)	(gCQO/m <sup>2</sup> .h)	(gDOC/m <sup>3</sup> .h)	(gCQO/m <sup>3</sup> .h)
1	204	401	0,15	0,59	161,18	655,73
2	170	276	0,33	1,28	366,88	1421,46
3	161	241	0,38	1,48	423,37	1641,49
4	123	172	0,59	1,86	657,19	2064,40
5	102	135	0,71	2,06	788,84	2290,31
6	100	125	0,72	2,12	801,18	2351,71
7	105	117	0,69	2,16	767,53	2397,00
8	95	109	0,75	2,20	829,98	2447,40
9	92	115	0,76	2,17	845,42	2411,58
10	98	82	0,73	2,36	813,46	2617,79

Quadro 17 – Fase 2 – Id 4 a 5

Tempo, d	S <sub>1</sub> , md		Fluxo mássico <sub>área</sub>		Fluxo mássico <sub>volume</sub>	
	DOC (mgC/l)	CQO (mgO <sub>2</sub> /l)	(gDOC/m <sup>2</sup> .h)	(gCQO/m <sup>2</sup> .h)	(gDOC/m <sup>3</sup> .h)	(gCQO/m <sup>3</sup> .h)
1	175	340	0,31	0,93	255,13	772,52
2	80	261	0,83	1,37	693,29	1137,67
3	82	106	0,82	2,22	683,34	1849,55
4	86	101	0,80	2,25	664,55	1874,50
5	86	103	0,80	2,24	663,77	1866,25
6	86	79	0,79	2,37	661,95	1974,28
7	85	72	0,80	2,41	669,98	2005,55
8	81	78	0,83	2,37	688,68	1977,54
9	83	78	0,82	2,38	679,47	1979,46
10	83	78	0,81	2,37	676,55	1978,12

Quadro 18 – Fase 2 – Id 5 a 6

Tempo, d	S <sub>1</sub> , md		Fluxo mássico <sub>área</sub>		Fluxo mássico <sub>volume</sub>	
	DOC (mgC/l)	CQO (mgO <sub>2</sub> /l)	(gDOC/m <sup>2</sup> .h)	(gCQO/m <sup>2</sup> .h)	(gDOC/m <sup>3</sup> .h)	(gCQO/m <sup>3</sup> .h)
1	146	405	0,39	0,57	179,20	258,10
2	79	178	0,83	1,82	378,95	828,09
3	78	188	0,84	1,77	380,84	804,44
4	82	155	0,82	1,95	371,78	885,45
5	79	124	0,83	2,12	378,90	964,26
6	78	100	0,84	2,25	381,62	1023,61
7	78	77	0,84	2,38	381,30	1083,26
8	79	77	0,84	2,38	380,22	1081,17
9	79	76	0,83	2,39	379,15	1084,31
10	79	77	0,84	2,38	379,84	1082,22

Nas Figuras 24 a 47 mostram-se os valores de DOC, CQO, SST e SSV registrados e os valores médios diários obtidos durante a Fase 2 de ensaios

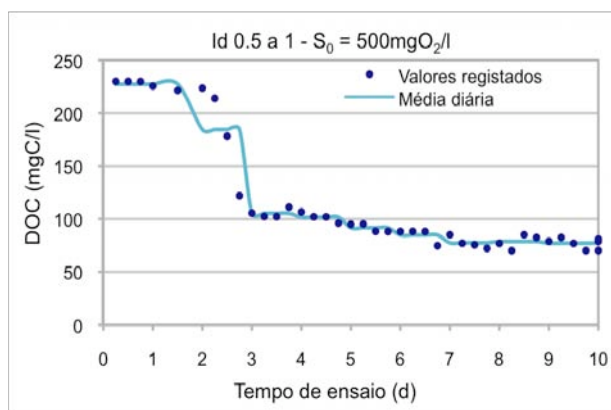


Figura 24 – Valores de DOC registrados e médios diários para Id 0,5 a 1. Fase 2

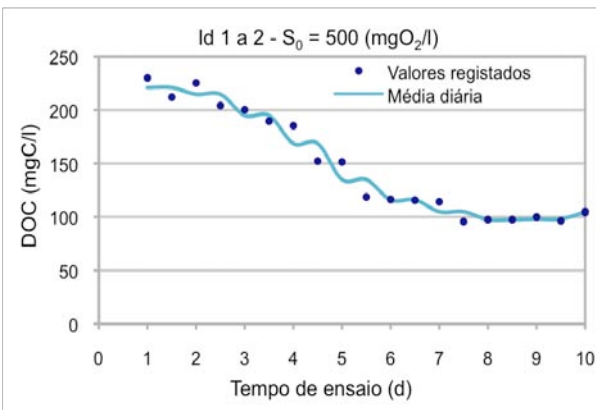


Figura 25 – Valores de DOC registrados e médios diários para Id 1 a 2. Fase 2

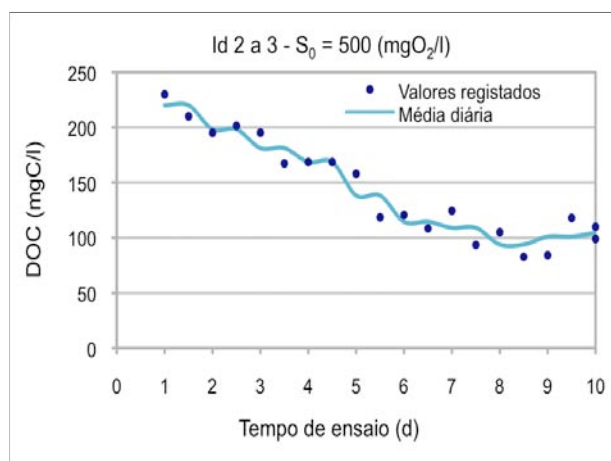


Figura 26 – Valores de DOC registrados e médios diários para Id 2 a 3. Fase 2

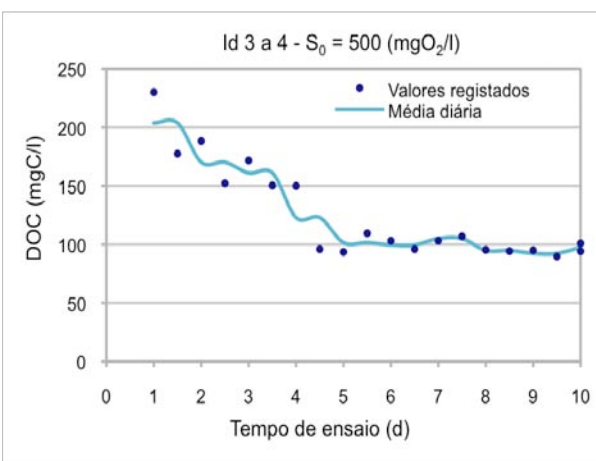


Figura 27 – Valores de DOC registrados e médios diários para Id 3 a 4. Fase 2

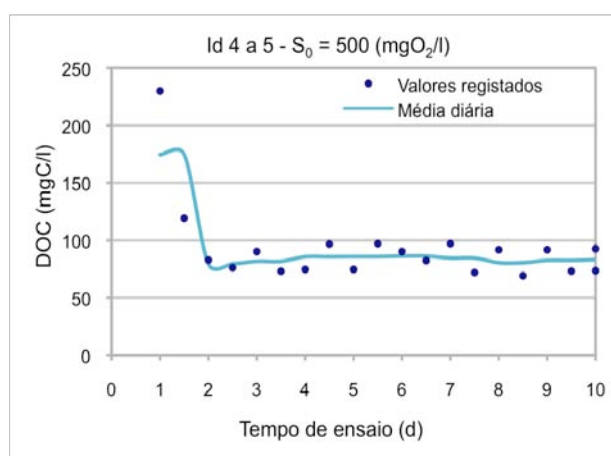


Figura 28 – Valores de DOC registrados e médios diários para Id 4 a 5. Fase 2

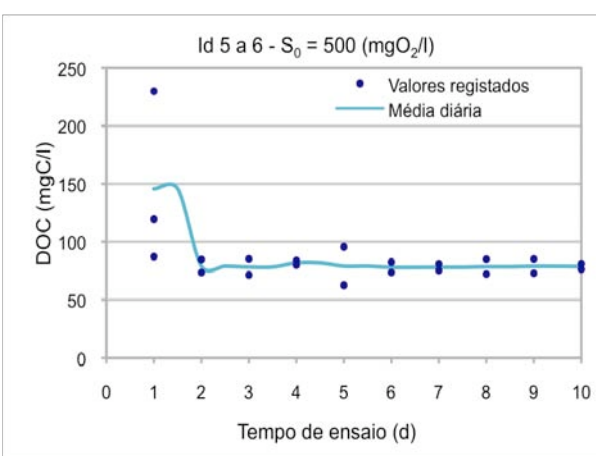


Figura 29 – Valores de DOC registrados e médios diários para Id 5 a 6. Fase 2

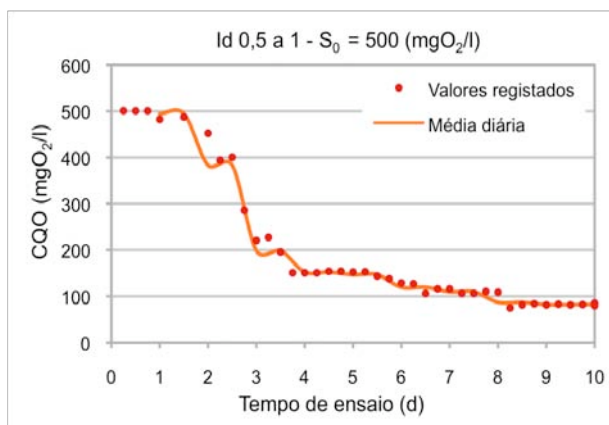


Figura 30 – Valores de CQO registrados e médios diários para Id 0,5 a 1. Fase 2

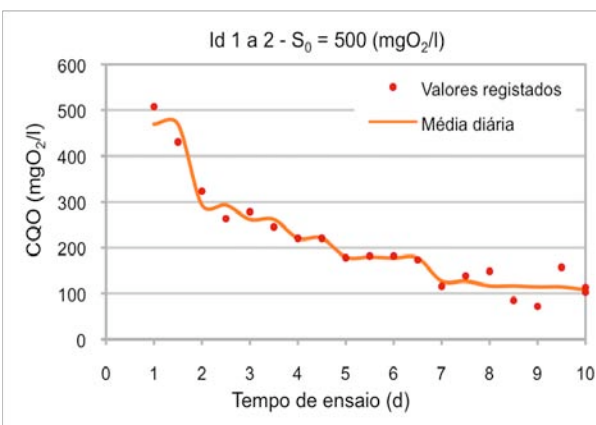


Figura 31 – Valores de CQO registrados e médios diários para Id 1 a 2. Fase 2

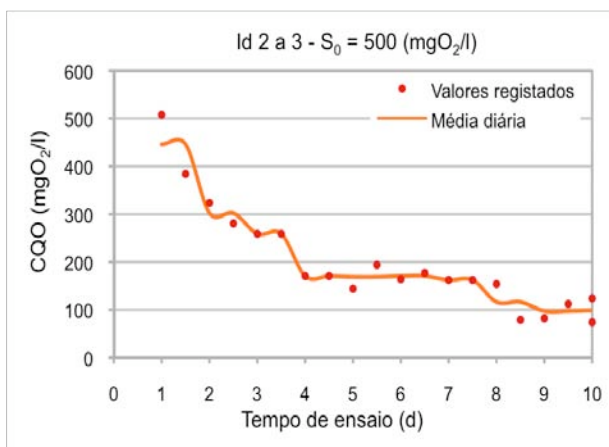


Figura 32 – Valores de CQO registrados e médios diários para Id 2 a 3. Fase 2

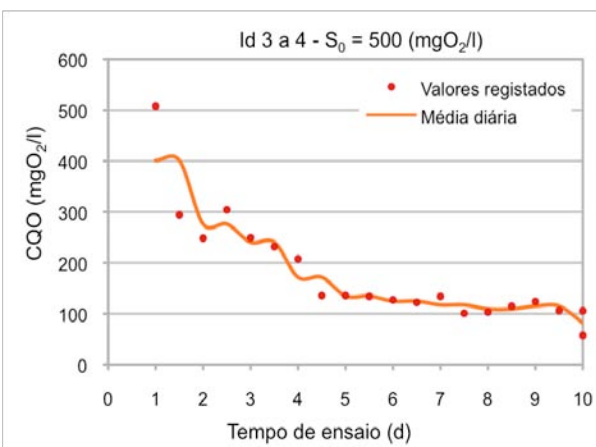


Figura 33 – Valores de CQO registrados e médios diários para Id 3 a 4. Fase 2

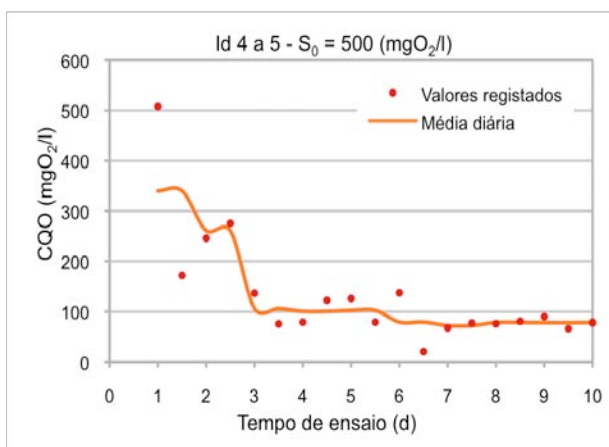


Figura 34 – Valores de CQO registrados e médios diários para Id 4 a 5. Fase 2

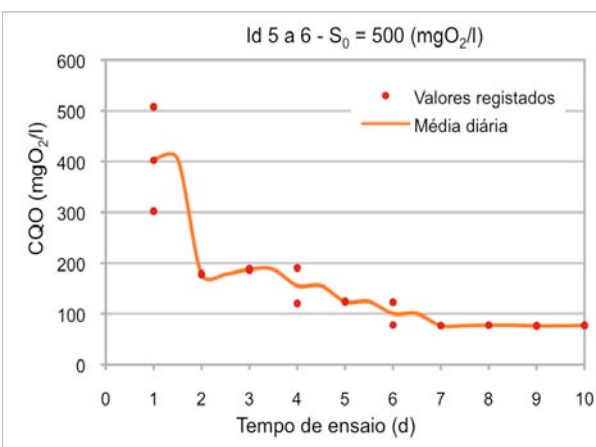


Figura 35 – Valores de CQO registrados e médios diários para Id 5 a 6. Fase 2

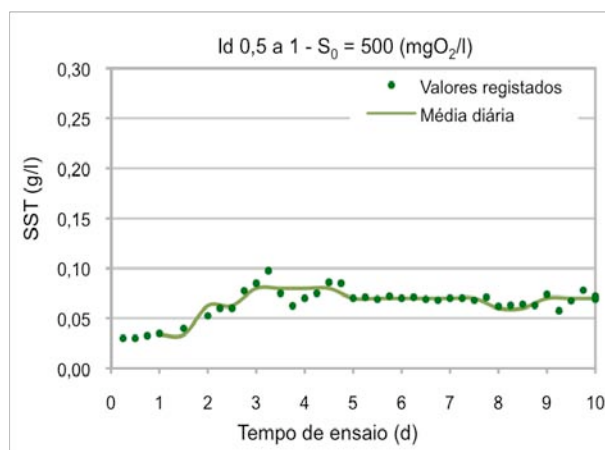


Figura 36 – Valores de SST registrados e médios diários para Id 0,5 a 1. Fase 2

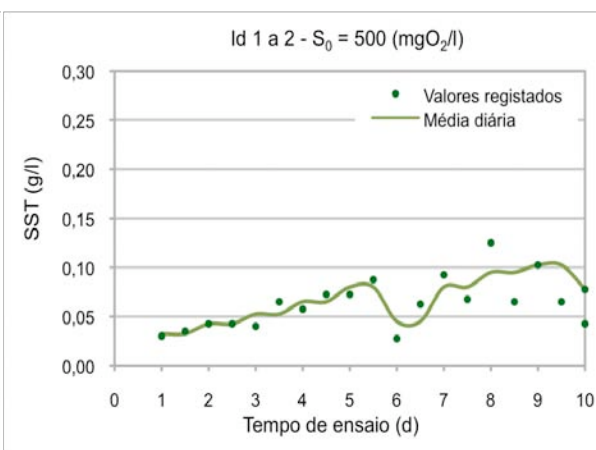


Figura 37 – Valores de SST registrados e médios diários para Id 1 a 2. Fase 2

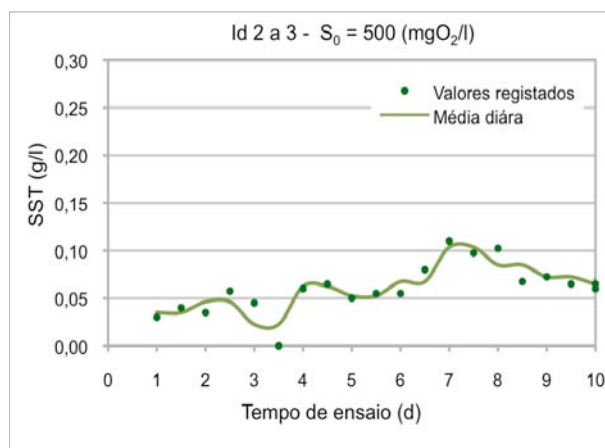


Figura 38 – Valores de SST registrados e médios diários para Id 2 a 3. Fase 2

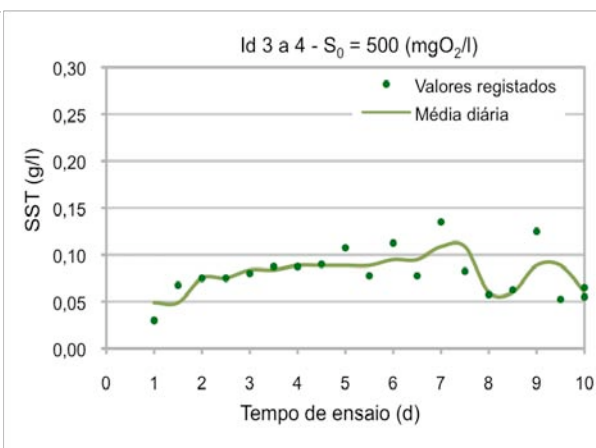


Figura 39 – Valores de SST registrados e médios diários para Id 3 a 4. Fase 2

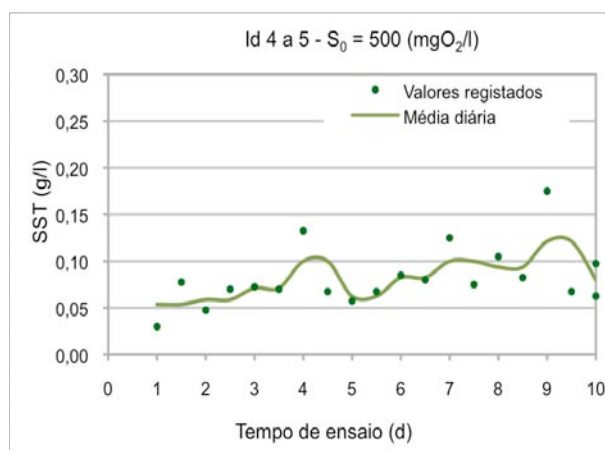


Figura 40 – Valores de SST registrados e médios diários para Id 4 a 5. Fase 2

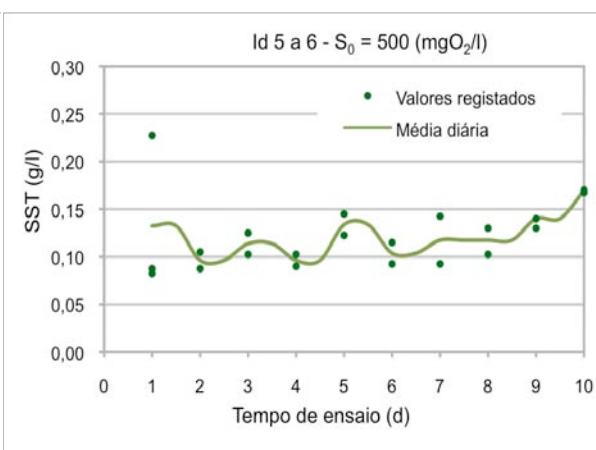


Figura 41 – Valores de SST registrados e médios diários para Id 5 a 6. Fase 2



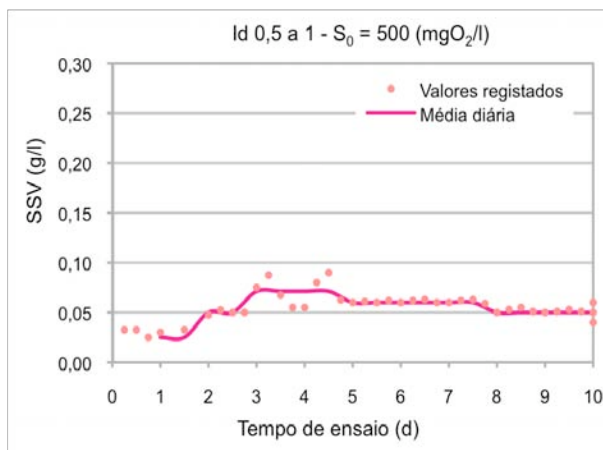


Figura 42 – Valores de SSV registrados e médios diários para Id 0,5 a 1. Fase 2

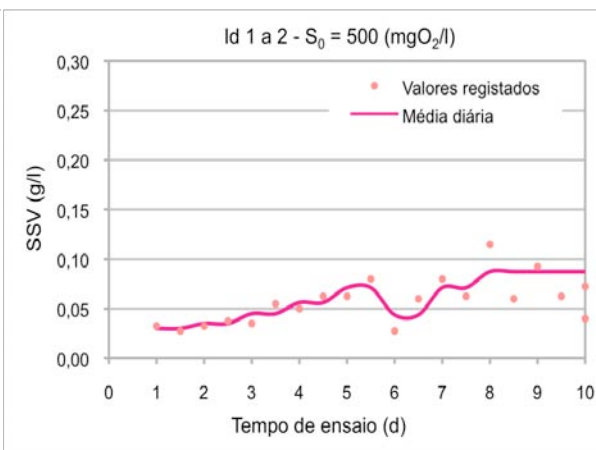


Figura 43 – Valores de SSV registrados e médios diários para Id 1 a 2. Fase 2

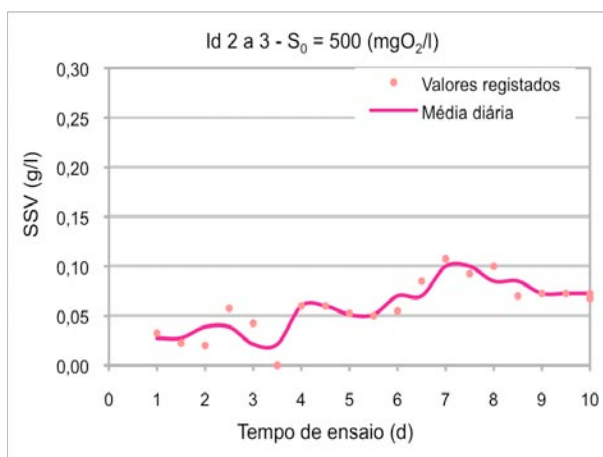


Figura 44 – Valores de SSV registrados e médios diários para Id 2 a 3. Fase 2

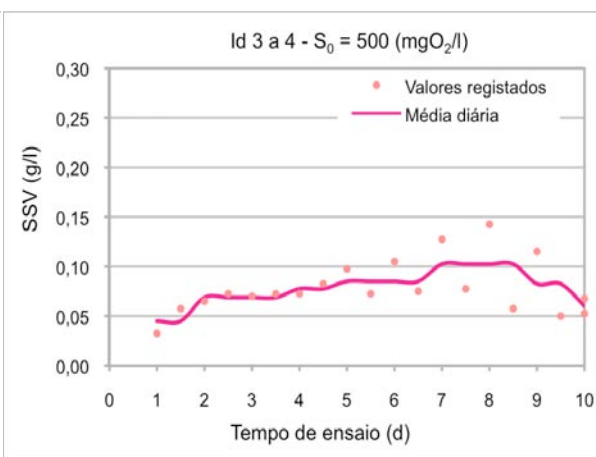


Figura 45 – Valores de SSV registrados e médios diários para Id 3 a 4. Fase 2

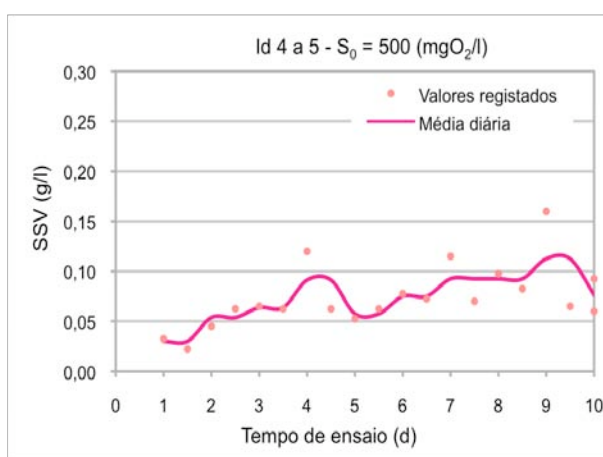


Figura 46 – Valores de SSV registrados e médios diários para Id 4 a 5. Fase 2

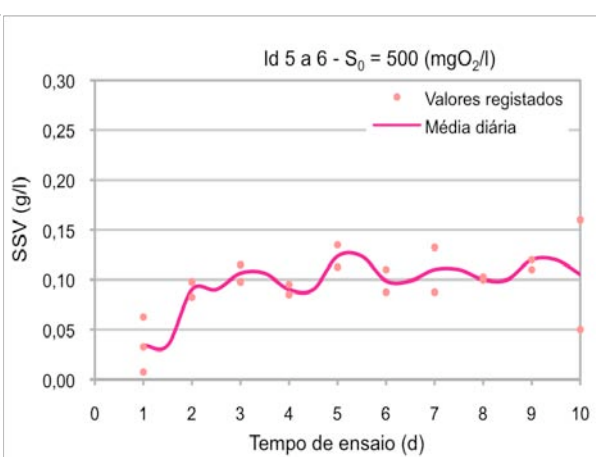


Figura 47 – Valores de SSV registrados e médios diários para Id 5 a 6 Fase 2

## 5.5. Resultados da Fase 3

### Apresentação de resultados

Nos Quadros 19 a 24 indicam-se os resultados obtidos durante a Fase 3, bem como os fluxos mássicos por unidade de área e de volume do biofilme.

Todos os valores registados são indicados no Anexos 3.

Quadro 19 – Fase 3 – Id 0,5 a 1

Tempo, d	S <sub>1</sub> , md		Fluxo mássico área		Fluxo mássico volume	
	DOC (mgC/l)	CQO (mgO <sub>2</sub> /l)	(gDOC/m <sup>2</sup> .h)	(gCQO/m <sup>2</sup> .h)	(gDOC/m <sup>3</sup> .h)	(gCQO/m <sup>3</sup> .h)
1	382	764	0,08	0,54	395,12	2694,03
2	166	457	1,81	2,86	9040,75	14322,10
3	146	424	2,01	3,11	10027,18	15565,50
4	144	373	2,02	3,34	10091,69	16716,80
5	142	309	2,03	3,72	10139,77	18604,92
6	138	262	2,05	4,01	10243,39	20055,55
7	136	221	2,06	4,21	10318,55	21045,66
8	132	172	2,08	4,49	10385,00	22473,27
9	126	163	2,11	4,60	10541,53	23002,86
10	126	163	2,12	4,67	10623,04	23348,25

Quadro 20 – Fase 3 – Id 1 a 2

Tempo, d	S <sub>1</sub> , md		Fluxo mássico área		Fluxo mássico volume	
	DOC (mgC/l)	CQO (mgO <sub>2</sub> /l)	(gDOC/m <sup>2</sup> .h)	(gCQO/m <sup>2</sup> .h)	(gDOC/m <sup>3</sup> .h)	(gCQO/m <sup>3</sup> .h)
1	446	801	0,35	1,11	709,01	2210,49
2	255	467	1,41	2,95	2820,58	5894,63
3	176	340	1,85	3,65	3696,48	7303,81
4	166	241	1,90	4,20	3801,48	8399,84
5	150	270	1,99	4,04	3975,01	8077,48
6	138	221	2,06	4,31	4114,27	8620,89
7	129	189	2,11	4,49	4211,53	8970,89
8	128	174	2,11	4,57	4220,37	9136,67
9	129	172	2,11	4,58	4216,50	9164,30
10	128	172	2,11	4,58	4220,37	9155,09

Quadro 21 – Fase 3 – Id 2 a 3

Tempo, d	S <sub>1</sub> , md		Fluxo mássico área		Fluxo mássico volume	
	DOC (mgC/l)	CQO (mgO <sub>2</sub> /l)	(gDOC/m <sup>2</sup> .h)	(gCQO/m <sup>2</sup> .h)	(gDOC/m <sup>3</sup> .h)	(gCQO/m <sup>3</sup> .h)
1	435	821	0,41	0,99	460,52	1105,24
2	193	564	1,75	2,41	1946,46	2681,24
3	169	474	1,89	2,91	2095,66	3233,86
4	159	372	1,94	3,48	2155,22	3863,23
5	135	232	2,07	4,25	2301,67	4722,87
6	128	183	2,11	4,52	2345,88	5019,64
7	127	171	2,12	4,59	2351,40	5096,40
8	128	172	2,11	4,58	2346,18	5086,16
9	127	171	2,11	4,59	2348,95	5096,40
10	128	171	2,11	4,58	2345,88	5091,28

Quadro 22 – Fase 3 – Id 3 a 4

Tempo, d	S <sub>1</sub> , md		Fluxo mássico <sub>área</sub>		Fluxo mássico <sub>volum</sub>	
	DOC (mgC/l)	CQO (mgO <sub>2</sub> /l)	(gDOC/m <sup>2</sup> .h)	(gCQO/m <sup>2</sup> .h)	(gDOC/m <sup>3</sup> .h)	(gCQO/m <sup>3</sup> .h)
1	350	657	0,88	1,90	802,56	1729,03
2	179	397	1,83	3,33	1665,65	3031,04
3	175	262	1,85	4,08	1683,23	3713,45
4	154	247	1,97	4,16	1786,73	3784,62
5	142	237	2,03	4,22	1848,27	3839,04
6	133	222	2,08	4,31	1891,82	3914,40
7	128	213	2,11	4,35	1918,30	3956,27
8	126	212	2,12	4,36	1928,07	3960,45
9	126	211	2,12	4,37	1928,90	3968,83
10	126	212	2,12	4,36	1928,95	3964,64

Quadro 23 – Fase 3 – Id 4 a 5

Tempo, d	S <sub>1</sub> , md		Fluxo mássico <sub>área</sub>		Fluxo mássico <sub>volum</sub>	
	DOC (mgC/l)	CQO (mgO <sub>2</sub> /l)	(gDOC/m <sup>2</sup> .h)	(gCQO/m <sup>2</sup> .h)	(gDOC/m <sup>3</sup> .h)	(gCQO/m <sup>3</sup> .h)
1	352	932	0,87	0,38	397,64	171,65
2	185	674	1,79	1,81	815,49	820,56
3	165	437	1,90	3,11	865,73	1415,05
4	154	390	1,97	3,38	895,50	1534,36
5	139	332	2,05	3,69	931,29	1678,80
6	134	292	2,08	3,92	943,73	1781,37
7	129	240	2,11	4,20	958,17	1911,15
8	127	191	2,12	4,48	963,45	2034,65
9	127	177	2,12	4,55	961,44	2068,14
10	127	177	2,11	4,55	961,18	2068,14

Quadro 24 – Fase 3 – Id 5 a 6

Tempo, d	S <sub>1</sub> , md		Fluxo mássico <sub>área</sub>		Fluxo mássico <sub>volum</sub>	
	DOC (mgC/l)	CQO (mgO <sub>2</sub> /l)	(gDOC/m <sup>2</sup> .h)	(gCQO/m <sup>2</sup> .h)	(gDOC/m <sup>3</sup> .h)	(gCQO/m <sup>3</sup> .h)
1	310	892	0,89	0,60	221,66	150,82
2	183	645	1,81	1,97	452,27	491,60
3	162	410	1,92	3,27	480,74	816,27
4	153	357	1,97	3,56	493,59	888,80
5	137	306	2,06	3,84	515,82	960,18
6	132	264	2,09	4,07	521,74	1017,74
7	128	239	2,11	4,21	528,03	1052,28
8	126	181	2,12	4,53	530,86	1132,87
9	126	177	2,12	4,55	530,38	1137,48
10	126	177	2,12	4,55	529,96	1137,48

Nas Figuras 48 a 71 mostram-se os valores de DOC, CQO, SST e SSV registrados e os valores médios diários obtidos durante a Fase 3 de ensaios.

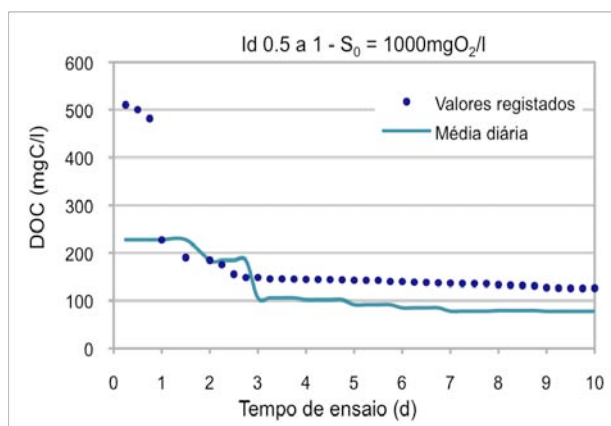


Figura 48 – Valores de DOC registrados e médios diários para Id 0,5 a 1. Fase 3

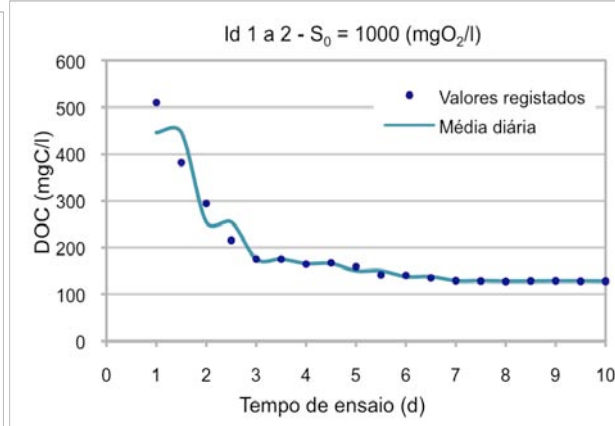


Figura 49 – Valores de DOC registrados e médios diários para Id 1 a 2. Fase 3

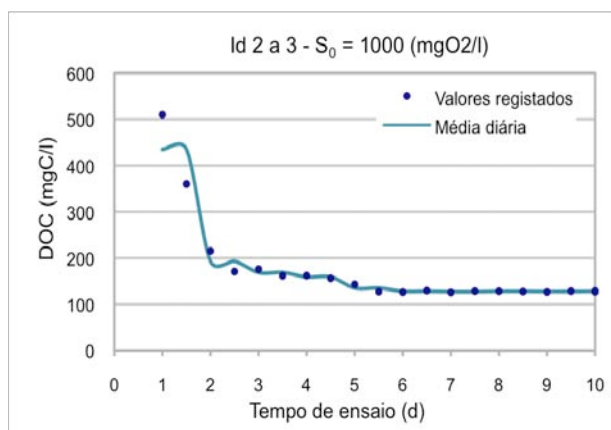


Figura 50 – Valores de DOC registrados e médios diários para Id 2 a 3. Fase 3

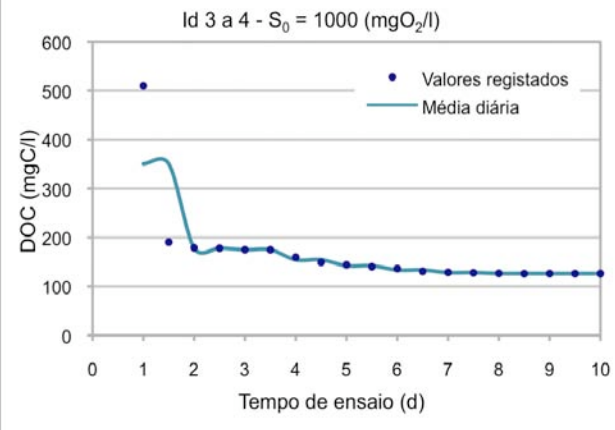


Figura 51 – Valores de DOC registrados e médios diários para Id 3 a 4. Fase 3

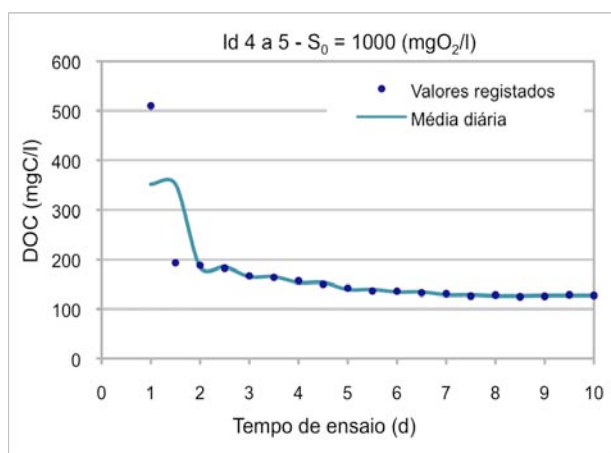


Figura 52 – Valores de DOC registrados e médios diários para Id 4 a 5. Fase 3

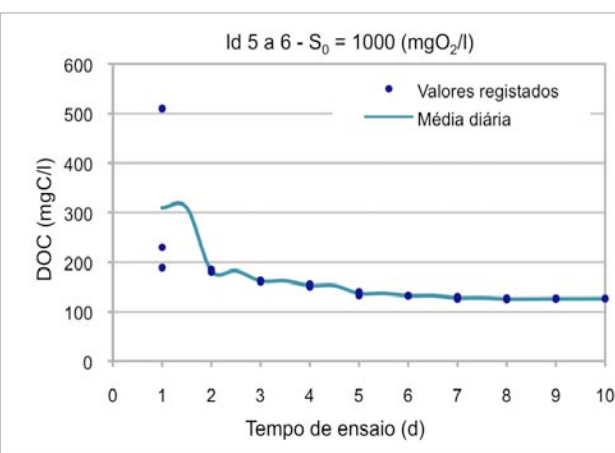


Figura 53 – Valores de DOC registrados e médios diários para Id 5 a 6. Fase 3

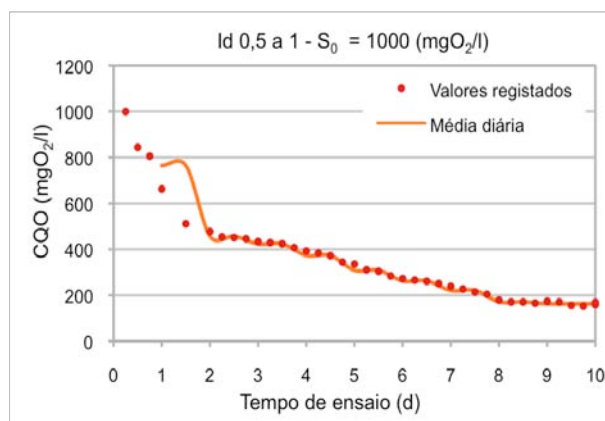


Figura 54 – Valores de CQO registrados e médios diários para Id 0,5 a 1. Fase 3

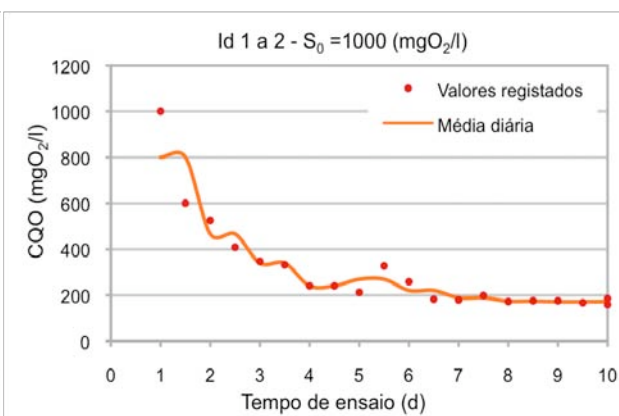


Figura 55 – Valores de CQO registrados e médios diários para Id 1 a 2. Fase 3

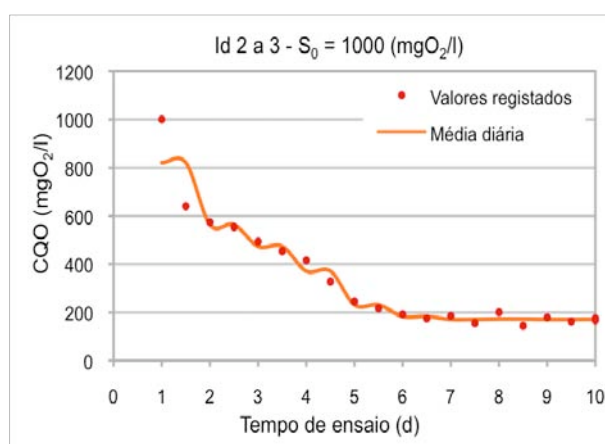


Figura 56 – Valores de CQO registrados e médios diários para Id 2 a 3. Fase 3

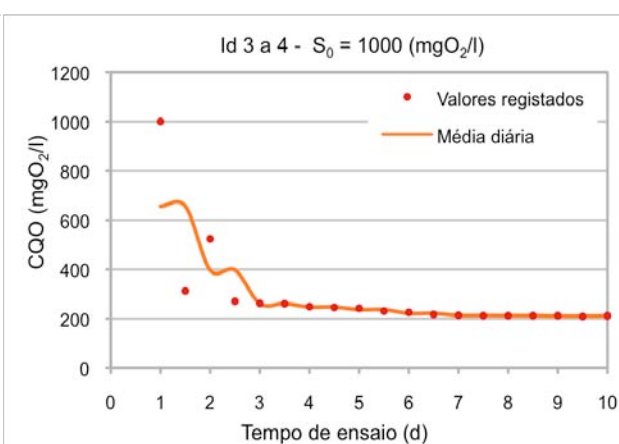


Figura 57 – Valores de CQO registrados e médios diários para Id 3 a 4. Fase 3

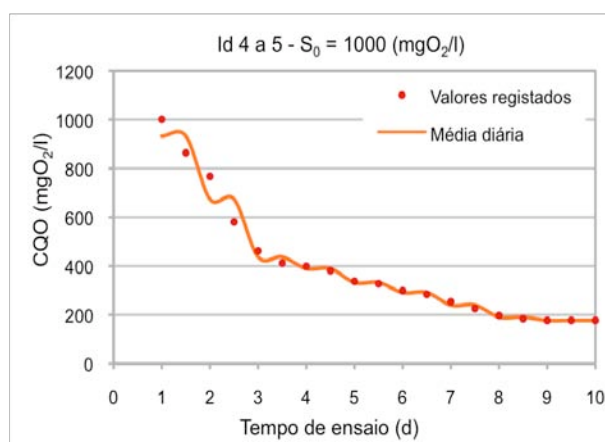


Figura 58 – Valores de CQO registrados e médios diários para Id 4 a 5. Fase 3

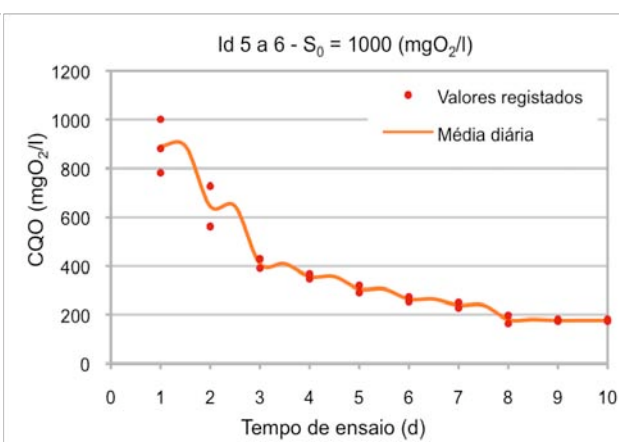


Figura 59 – Valores de CQO registrados e médios diários para Id 5 a 6. Fase 3

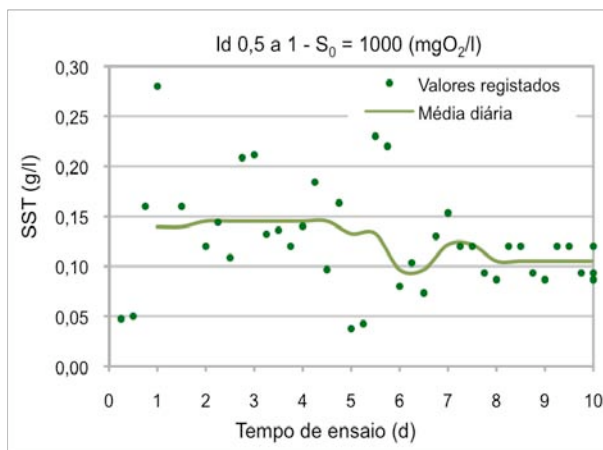


Figura 60 – Valores de SST registrados e médios diários para Id 0,5 a 1. Fase 3

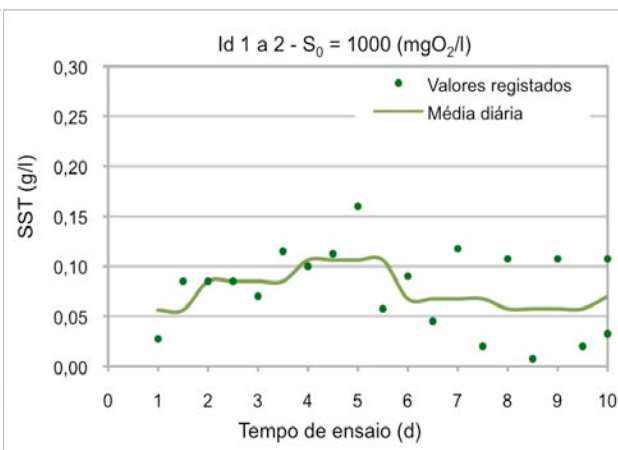


Figura 61 – Valores de SST registrados e médios diários para Id 1 a 2. Fase 3

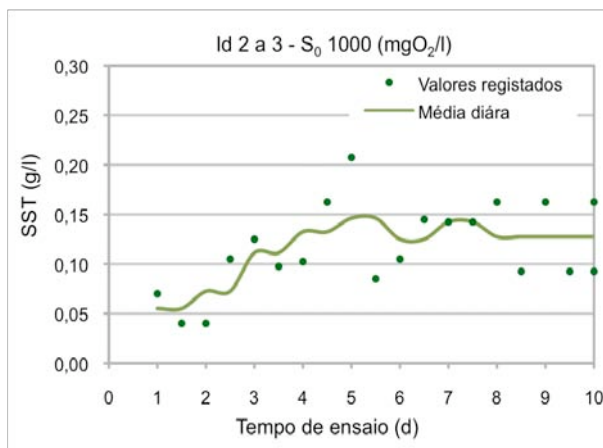


Figura 62 – Valores de SST registrados e médios diários para Id 2 a 3. Fase 3

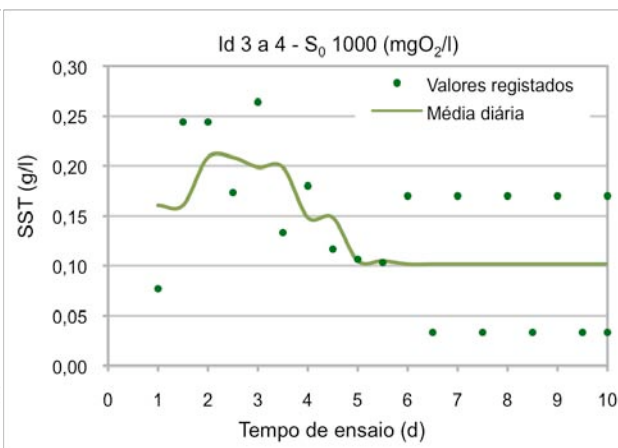


Figura 63 – Valores de SST registrados e médios diários para Id 3 a 4. Fase 3

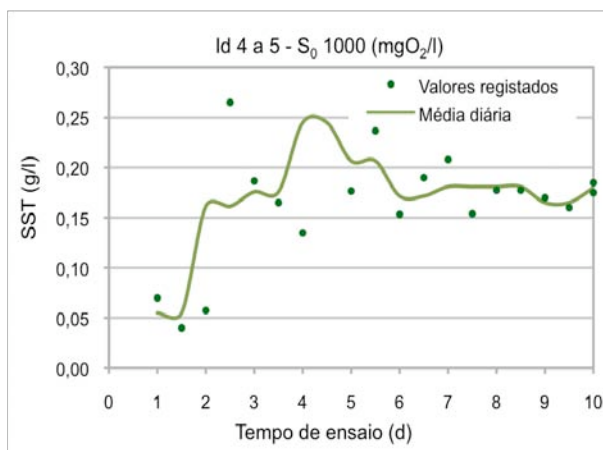


Figura 64 – Valores de SST registrados e médios diários para Id 4 a 5. Fase 3

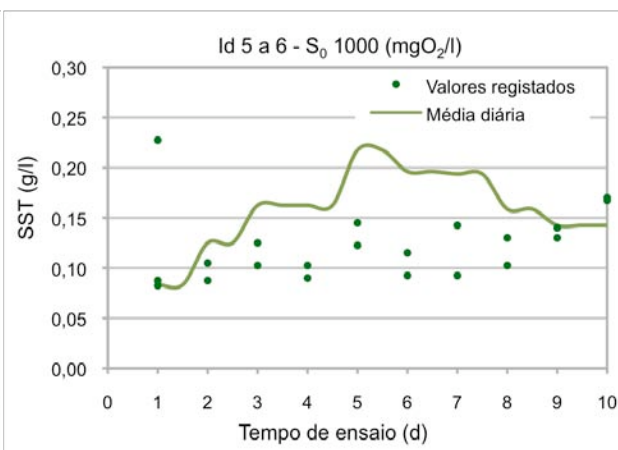


Figura 65 – Valores de SST registrados e médios diários para Id 5 a 6. Fase 3

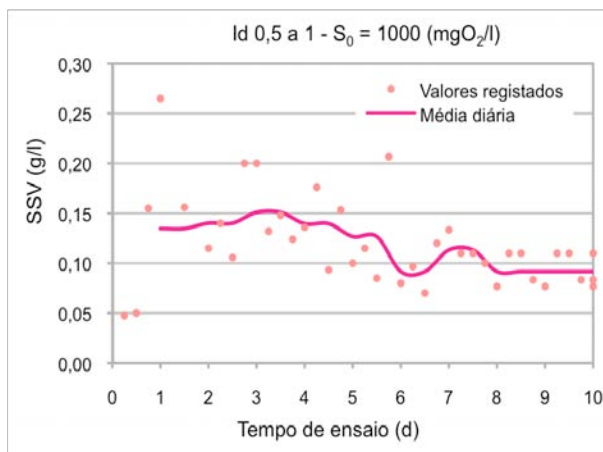


Figura 66 – Valores de SSV registrados e médios diários para Id 0,5 a 1. Fase 3

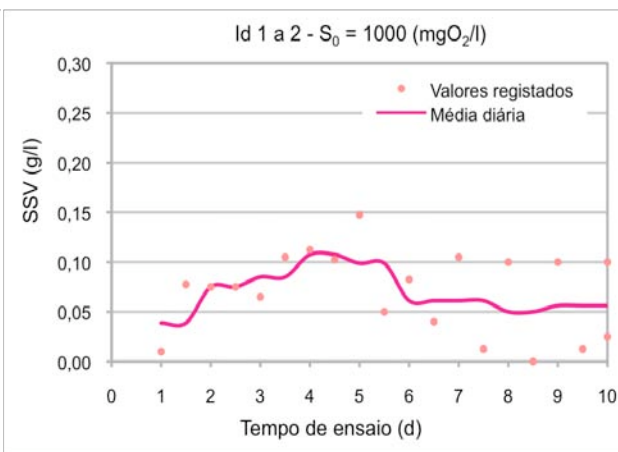


Figura 67 – Valores de SSV registrados e médios diários para Id 1 a 2. Fase 3

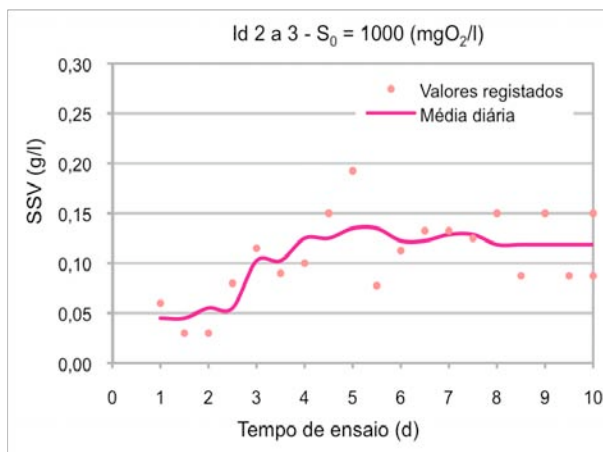


Figura 68 – Valores de SSV registrados e médios diários para Id 2 a 3. Fase 3

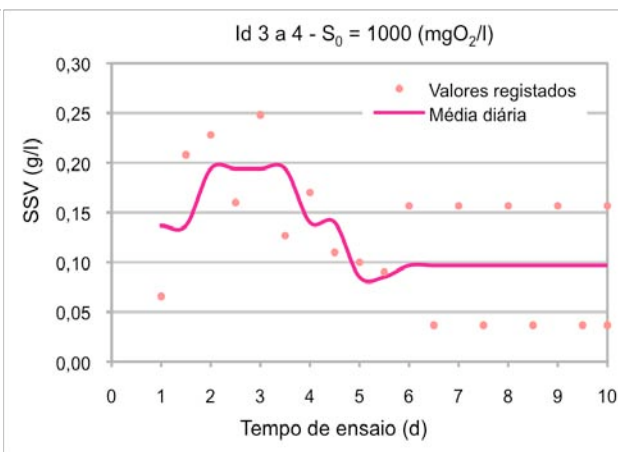


Figura 69 – Valores de SSV registrados e médios diários para Id 3 a 4. Fase 3

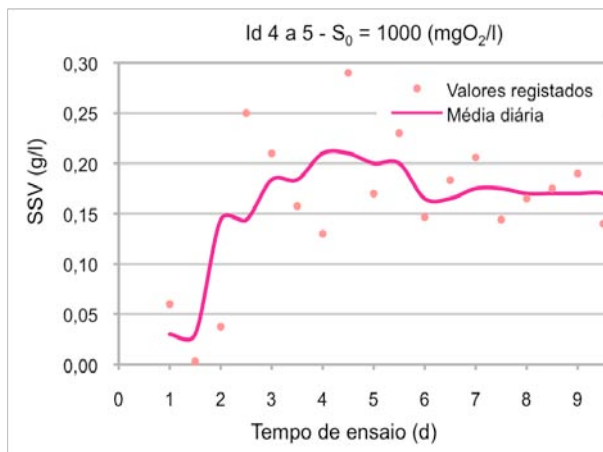


Figura 70 – Valores de SSV registrados e médios diários para Id 2 a 3. Fase 3

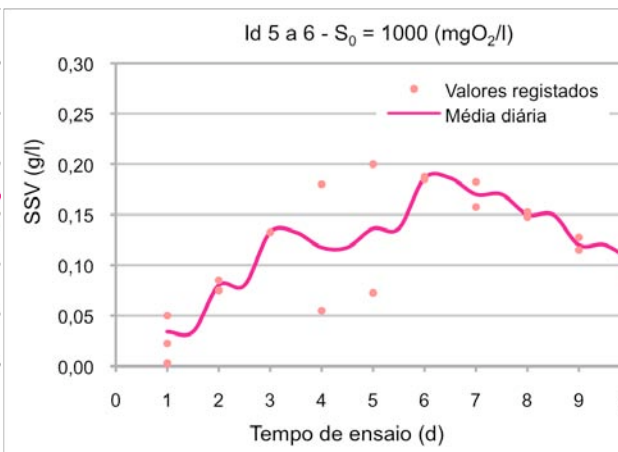


Figura 71 – Valores de SSV registrados e médios diários para Id 3 a 4. Fase 3



Nas Figuras 72 a 77 mostram-se as observações da estrutura do biofilme para as várias idades estudadas, através de microscopia electrónica – observação a duas dimensões.

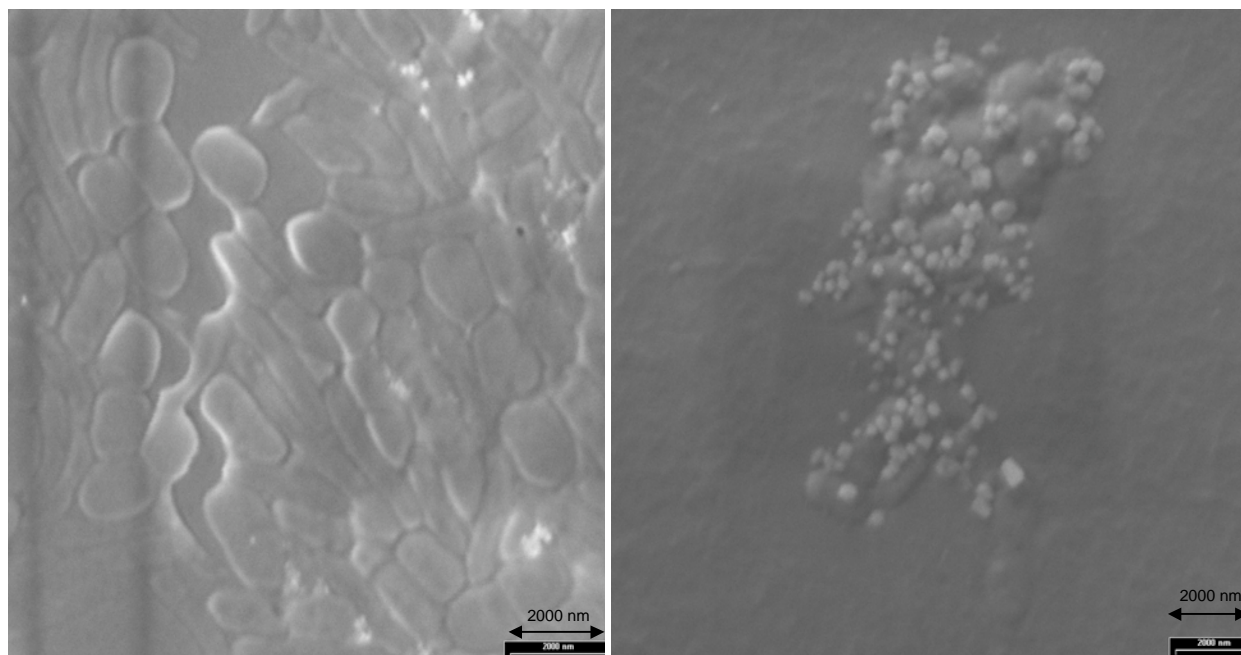


Figura 72 – Aspecto do biofilme com Id de 0,5 a 1 dia com  $S_0 = 500 \text{ mgO}_2/\text{l} - \text{CQO}$  e  $S_0 = 1000 \text{ mgO}_2/\text{l} - \text{CQO}$ , respectivamente.

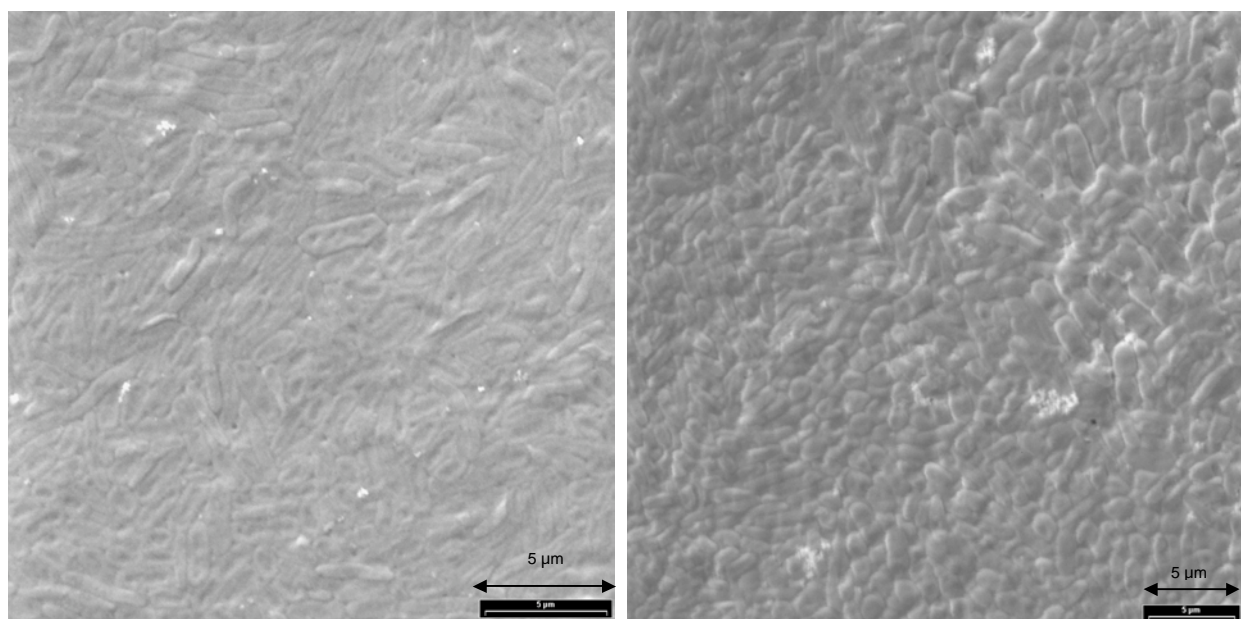


Figura 73 – Aspecto do biofilme com Id de 1 a 2 dias com  $S_0 = 500 \text{ mgO}_2/\text{l} - \text{CQO}$  e  $S_0 = 1000 \text{ mgO}_2/\text{l} - \text{CQO}$ , respectivamente.



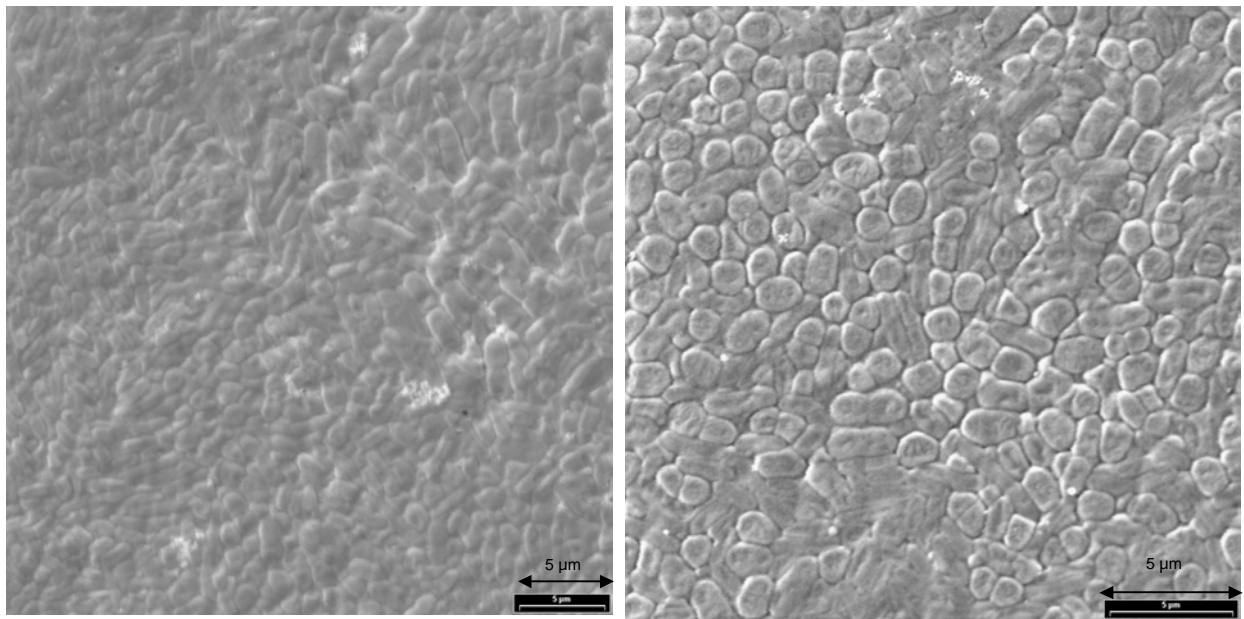


Figura 74 – Aspecto do biofilme com Id de 2 a 3 dias com  $S_0 = 500 \text{ mgO}_2/\text{l} - \text{CQO}$  e  $S_0 = 1000 \text{ mgO}_2/\text{l} - \text{CQO}$ , respectivamente.

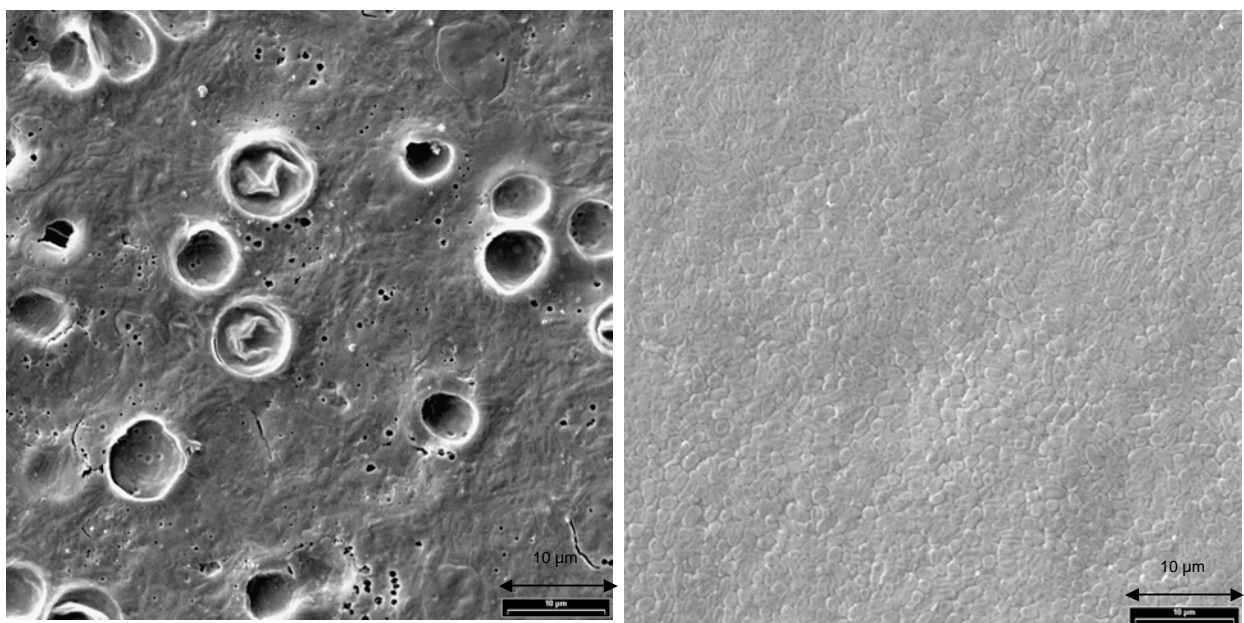


Figura 75 – Aspecto do biofilme com Id de 3 e 4 dias com  $S_0 = 500 \text{ mgO}_2/\text{l} - \text{CQO}$  e  $S_0 = 1000 \text{ mgO}_2/\text{l} - \text{CQO}$ , respectivamente.

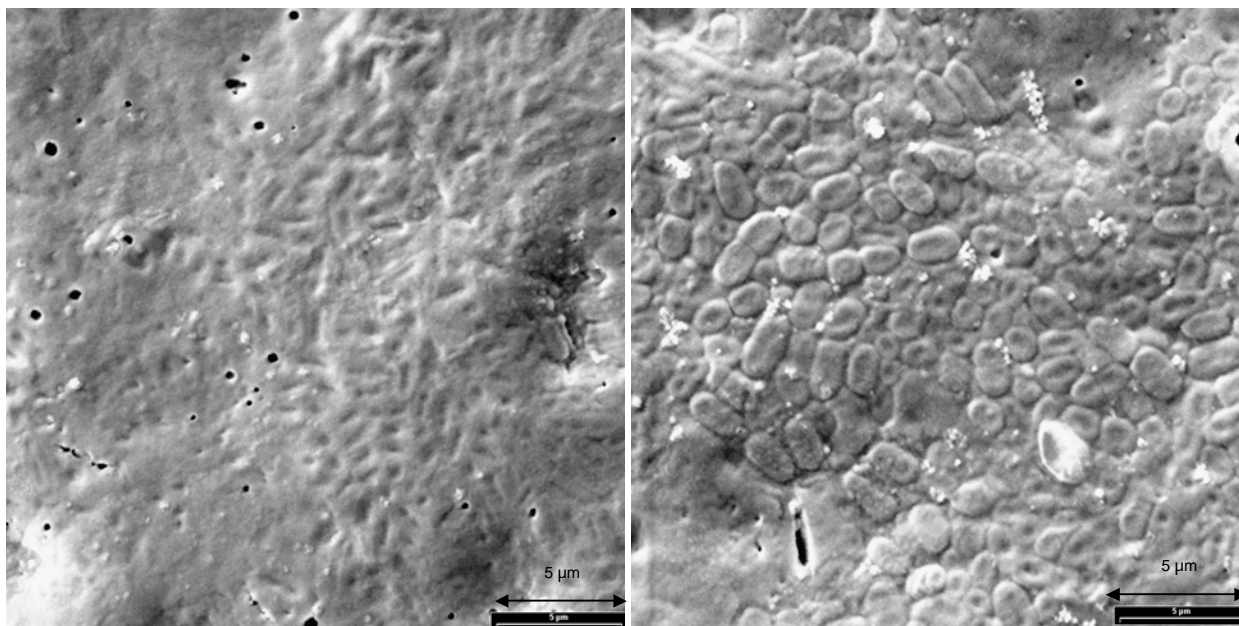


Figura 76 – Aspecto do biofilme com Id de 4 a 5 dias com  $S_0 = 500 \text{ mgO}_2/\text{l} - \text{CQO}$  e  $S_0 = 1000 \text{ mgO}_2/\text{l} - \text{CQO}$ , respectivamente.

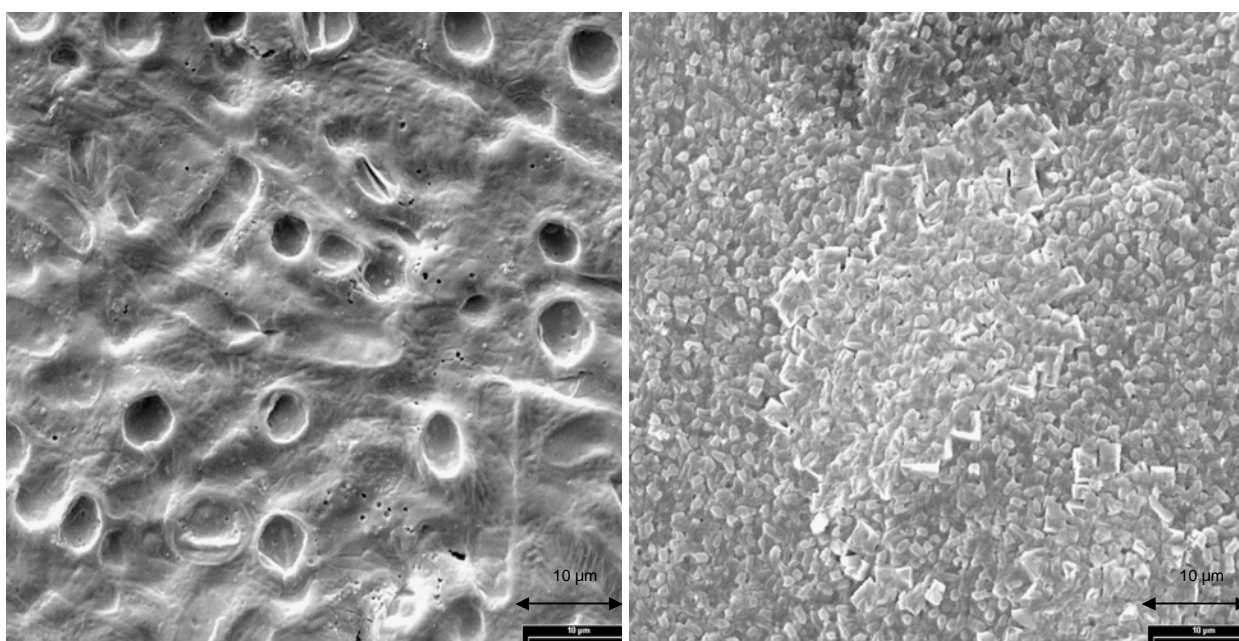


Figura 77 – Aspecto do biofilme com Id de 5 e 6 dias com  $S_0 = 500 \text{ mgO}_2/\text{l} - \text{CQO}$  e  $S_0 = 1000 \text{ mgO}_2/\text{l} - \text{CQO}$ , respectivamente.

As figuras parecem indicar mostram que para a idade do biofilme menor (Id 0,5 a 1 d), aparentemente estão presentes poucas espécies de microrganismos e que existe ainda superfície do meio de suporte que não foi colonizada, pelo que, não é expectável a presença de fenómenos de competição e, ou predação e, consequentemente, de processos inibitórios. Por outro lado, é notório que à medida que a idade do biofilme aumenta a estrutura do biofilme altera-se, adensando-se, estando presentes diferentes formas de estrutura, podendo esta alteração indicar, possivelmente, a presença de diferentes espécies de microrganismos no biofilme e uma alternância destas, de idade para idade.



## 5.6. Exploração de Resultados

Nas Figuras 78 a 85 sintetizam-se os resultados obtidos (valores médios diários) nas Fases 2 e 3, relativos à evolução de DOC, CQO, SST e SSV.

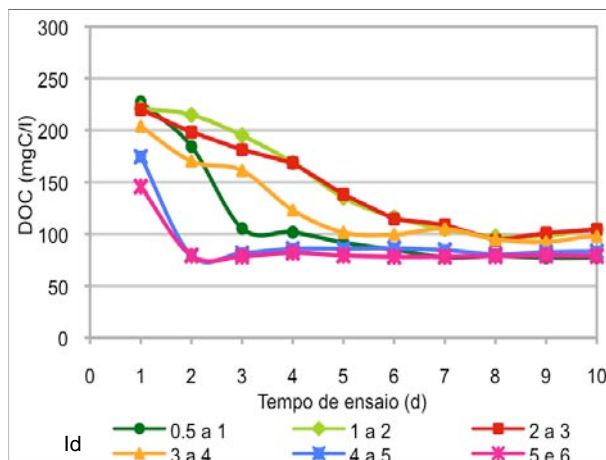


Figura 78 – Valores médios diários (DOC) para as idades de biofilme analisadas – Fase 2

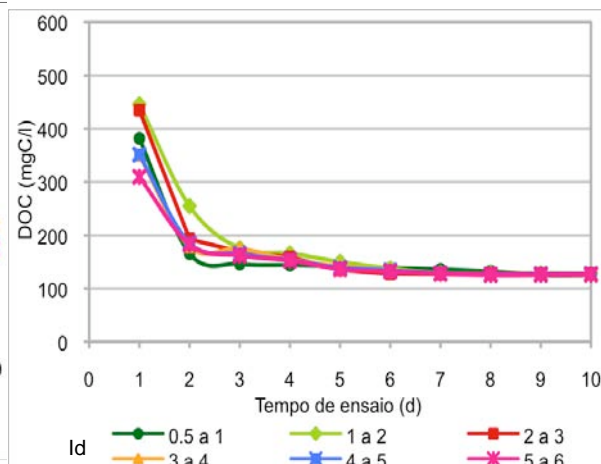


Figura 79 – Valores médios diários (DOC) para as idades de biofilme analisadas – Fase 3

Através dos resultados obtidos com DOC, constata-se que, na Fase 2, se atingiu o regime quase estacionário em todas as experiências, a partir do oitavo dia, aproximadamente, verificando-se que esta situação era atingida ao quinto dia nas experiências com idade do biofilme mais elevada (entre 4 e 5 dias e entre 5 e 6 dias) e também na experiência com a mais baixa idade do biofilme testada (0,5 e 1 dia).

Relativamente à Fase 3, verificou-se que a estabilização era aproximadamente atingida a partir do quarto dia de ensaio em todas as experiências. Para além de atingir o período de estabilização num período de tempo mais curto, observou-se ainda que a evolução de substrato era semelhante, em todas as experiências, independentemente da idade do biofilme.

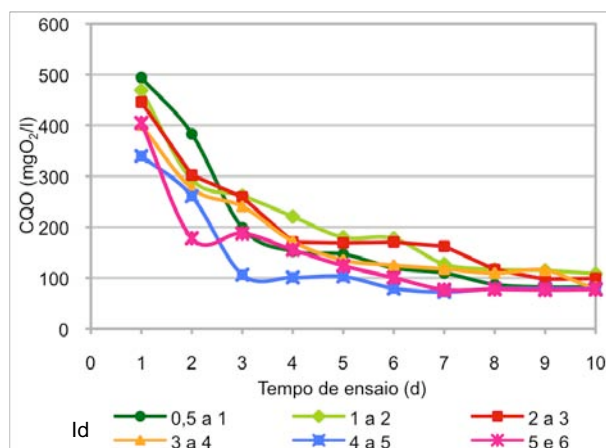


Figura 80 – Valores médios diários (CQO) para as idades de biofilme analisadas – Fase 2

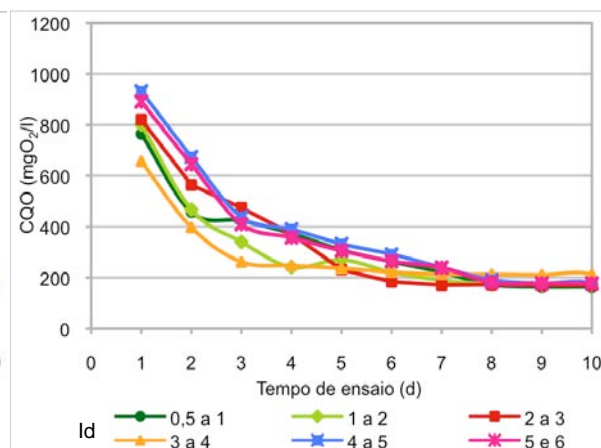


Figura 81 – Valores médios diários (CQO) para as idades de biofilme analisadas – Fase 3

À semelhança dos resultados obtidos com DOC, os resultados de CQO permitiram constatar que, para a Fase 2, o ensaio atingiu o regime quase estacionário, em todas as experiências, a partir do oitavo dia, tendo-se verificado que esta situação era logo atingida ao sexto dia nas experiências com idade do biofilme mais elevada (entre 4 e 5 dias e entre 5 e 6 dias) e também na experiência com a mais baixa idade do biofilme testada (0,5 e 1 dia). Embora os resultados com DOC e com CQO conduzam a interpretações semelhantes, constatou-se que existiram diferenças, embora pouco significativas, nomeadamente na experiência em que o biofilme tinha uma idade entre 3 e 4 dias, na qual se registou um comportamento muito semelhante às experiências referidas anteriormente (4 - 5 dias, entre 5 - 6 dias e 0,5 - 1 dia) nos resultados de CQO.

Relativamente à Fase 3, verificou-se que a estabilização era aproximadamente atingida a partir do oitavo dia de ensaio, em todas as experiências. Para além de se observar um período para estabilização mais curto, relativamente ao horizonte observado (10 dias), constatou-se ainda que a evolução de substrato seguia, em todas as experiências um padrão semelhante, independentemente da idade do biofilme. Contudo, note-se que o regime quase estacionário observado através de DOC e CQO não foi detectado ao mesmo tempo, havendo um atraso temporal de cerca de quatro dias.

Embora, para efeitos de análise dos resultados importar, fundamentalmente, os valores estabilizados é de admitir que a diferença detectada possa resultar de maior precisão do parâmetro DOC, face à natureza da sua determinação analítica.

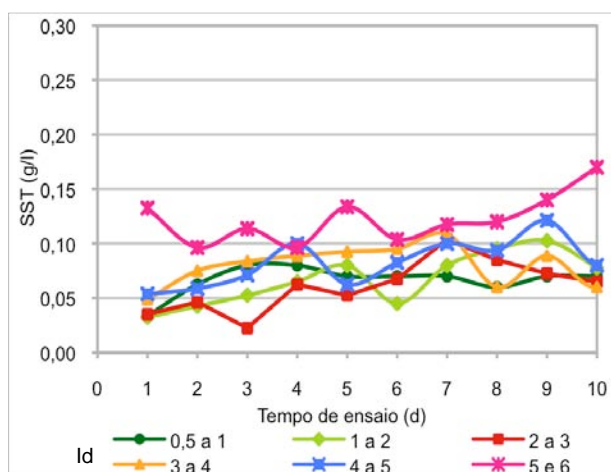


Figura 82 – Valores médios diários (SST) para as idades de biofilme analisadas – Fase 2

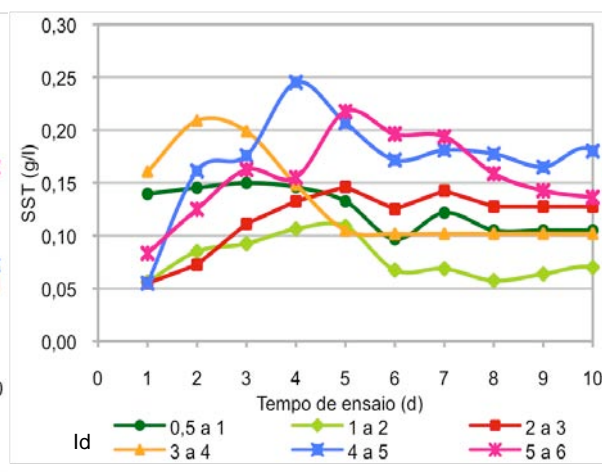


Figura 83 – Valores médios diários (SST) para as idades de biofilme analisadas – Fase 3

Através das Figuras 82 e 83 verifica-se, para as Fases 2 e 3, que os Sólidos Suspensos Totais no reactor se mantiveram relativamente constantes ao longo do tempo, registando-se concentrações mais elevadas nas experiências em que o biofilme era mais espesso, aspecto facilmente explicável devido a um maior número de células presentes na experiência. Contudo, considera-se que aquela variação, tanto ao longo do tempo, como entre experiências, não parece significativa de modo a poder alterar a interpretação do comportamento de um reactor de biomassa fixa, ou mais concretamente do respectivo biofilme.

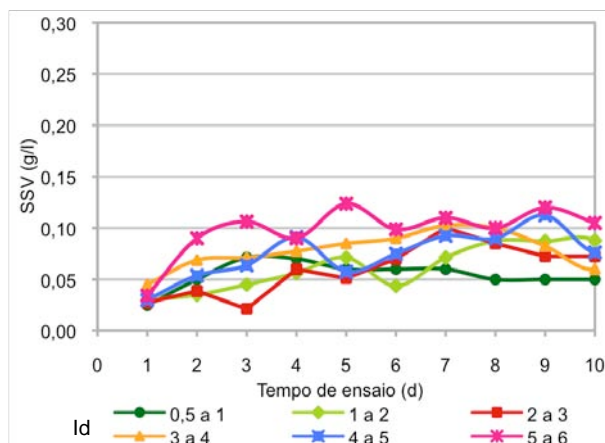


Figura 84 – Valores médios diários (SSV) para as idades de biofilme analisadas – Fase 2

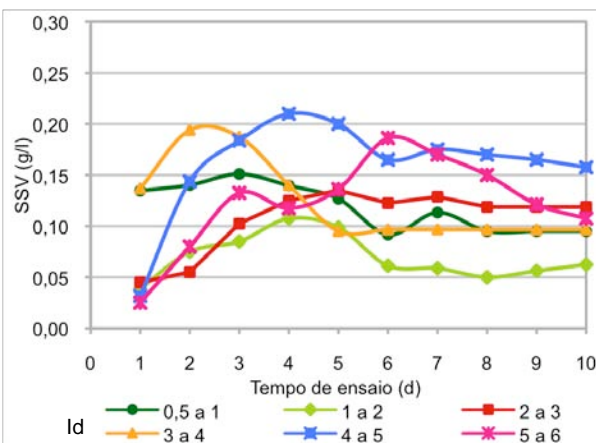


Figura 85 – Valores médios diários (SSV) para as idades de biofilme analisadas – Fase 3

À semelhança das figuras anteriores, verifica-se, através das Figuras 84 e 85, que tanto para a Fase 2 como para a Fase 3, os Sólidos Suspensos Voláteis no reactor se mantêm também relativamente constantes ao longo do tempo, registando-se concentrações mais elevadas nas experiências em que o biofilme era mais espesso. Considera-se que, face à baixa concentração de SSV registada na fase líquida do reactor, a degradação biológica verificada terá sido principalmente efectuada pela biomassa fixa ao suporte, não se tendo portanto valorizado a fracção da degradação biológica que, necessariamente, terá ocorrido no reactor resultante da biomassa em suspensão.

Nas Figuras 86 e 87 mostra-se a variação do fluxo mássico por unidade de área de suporte ( $\text{gC/m}^2\cdot\text{h}$  e  $\text{gO}_2/\text{m}^2\cdot\text{h}$ ), utilizando os valores registados em DOC e CQO, respectivamente, ao longo do tempo de ensaio, para as idades de biofilme analisadas durante a Fase 2.

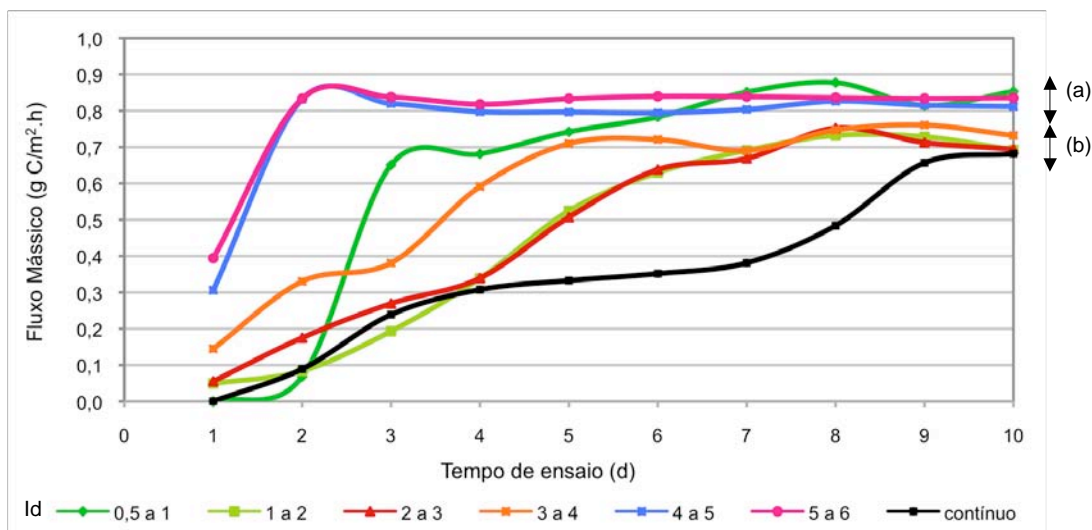


Figura 86 – Fluxo mássico, por unidade de área, ao longo do tempo de ensaio, para as idades de biofilme analisadas. - Fluxos mássicos calculados através de valores registados em DOC – Fase 2

Como se pode verificar através da Figura 86, detectam-se dois conjuntos de idades de biofilme que estabilizam em patamares diferentes (embora semelhantes dentro de cada conjunto) para além de estabilizarem em tempos de ensaio diferentes. Para as idades de biofilme mais elevadas (entre 4 e 5 dias e entre 5 e 6 dias) e para a idade de biofilme menor (entre 0,5 e 1 dia), a estabilização ocorre mais cedo, para além do correspondente fluxo mássico máximo ser mais elevado ((a): entre 0,8 e 0,85 g C / m².h).

Por outro lado, para as idades de biofilme intermédias, (entre 1 e 2 dias, entre 2 e 3 dias e entre 3 e 4 dias) a estabilização é mais lenta e o fluxo mássico é, comparativamente, menor ((b): entre 0,68 e 0,75 g C / m².h).

Note-se ainda, que a diferença de evolução do fluxo mássico respeitante ao ensaio contínuo é bastante mais lenta.

Na Figura 87 mostram-se os resultados dos ensaios apresentados na Figura 86, mas expressos em valores de CQO (g O<sub>2</sub>/m².h).

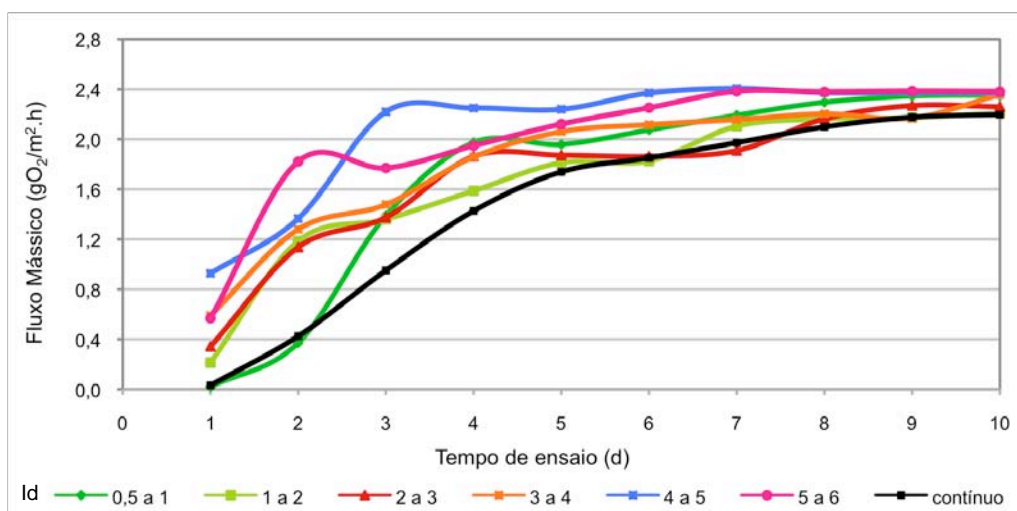


Figura 87 – Fluxo mássico, por unidade de área, ao longo do tempo de ensaio, para as idades de biofilme analisadas. – Fluxos mássicos calculados através de valores expressos em CQO – Fase 2.

Através da análise da Figura 87, verifica-se que a tendência de separação em dois grupos se mantém, à semelhança dos resultados obtidos com DOC, embora essa separação seja menos nítida. No entanto, continua a verificar-se que para as idades de biofilme mais elevadas (entre 4 e 5 dias e entre 5 e 6 dias) e para a idade mais baixa (entre 0,5 e 1 dia) a estabilização também ocorre mais cedo e os fluxos mássicos são igualmente mais elevados. Note-se também que para a idade de biofilme entre 3 e 4 dias, no último dia de ensaio, o fluxo mássico atingido é semelhante ao das experiências anteriormente referidas.

Nas Figuras 88 e 89 mostram-se os resultados obtidos, expressos em DOC e em CQO, para os valores de fluxo mássico por unidade de volume de biofilme ao longo do tempo de ensaio e para as várias idades de biofilme estudadas, durante a Fase 2.

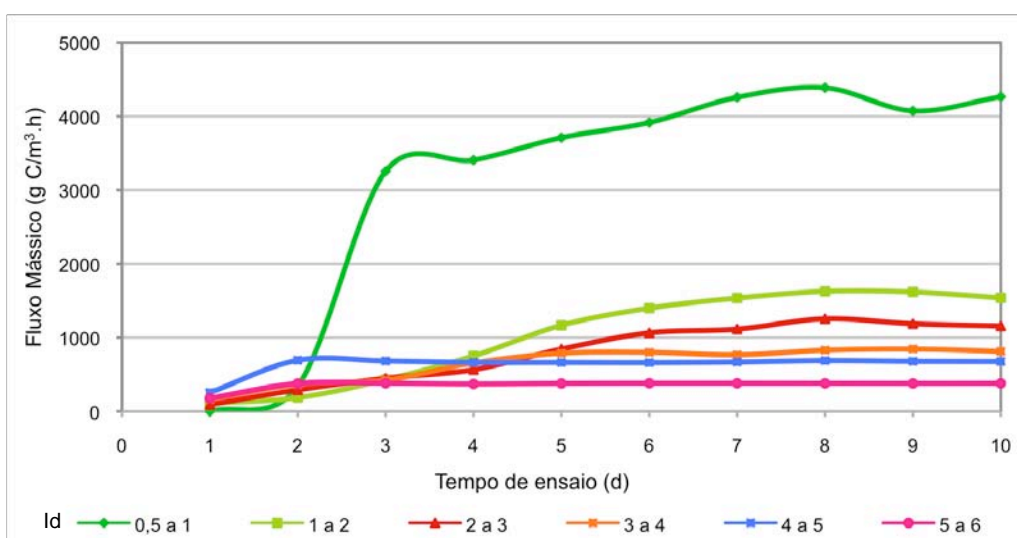


Figura 88 – Fluxo mássico, por unidade de volume de biofilme, ao longo do tempo de ensaio, para as idades de biofilme analisadas. – Fluxos mássicos calculados através de valores expressos em DOC ( $\text{g C} / \text{m}^3 \cdot \text{h}$ ) – Fase 2.

Constata-se que os valores de fluxo mássico por unidade de volume de biofilme referentes à idade de biofilme 0,5 - 1 dia são substancialmente superiores aos que se obtiveram para as restantes idades analisadas, o que deverá resultar da espessura de biofilme mais reduzida. Esta constatação, embora evidente, não deixa de ser interessante uma vez que com a idade de biofilme mais baixa se obtêm sempre os fluxos mássicos mais elevados, isto é, o seu valor é sempre superior aos das restantes idades em análise, tanto quando se trata de fluxo mássico por unidade de área, como para o fluxo mássico por unidade de volume de biofilme. Por outro lado, o mesmo não se verificou relativamente às idades de biofilme mais elevadas (4 - 5 dias e 5 - 6 dias), uma vez que os respectivos fluxos mássicos por unidade de área atingem os valores mais elevados (embora semelhantes ao da idade de biofilme mais baixa) e o mesmo já não se verifica quando se analisam os fluxos mássicos por unidade de volume de biofilme.

Desta análise, observa-se, como seria de esperar, que a espessura do biofilme desempenha um papel fundamental na degradação de um substrato orgânico e que a idade entre 0,5 e 1 dia é aquela onde se regista o fluxo mássico mais elevado (tanto por unidade de área como por unidade de volume de biofilme).

Na Figura 89 mostram-se os mesmos ensaios da figura 88, através dos valores de CQO ( $\text{g O}_2/\text{m}^3.\text{h}$ ) determinados.

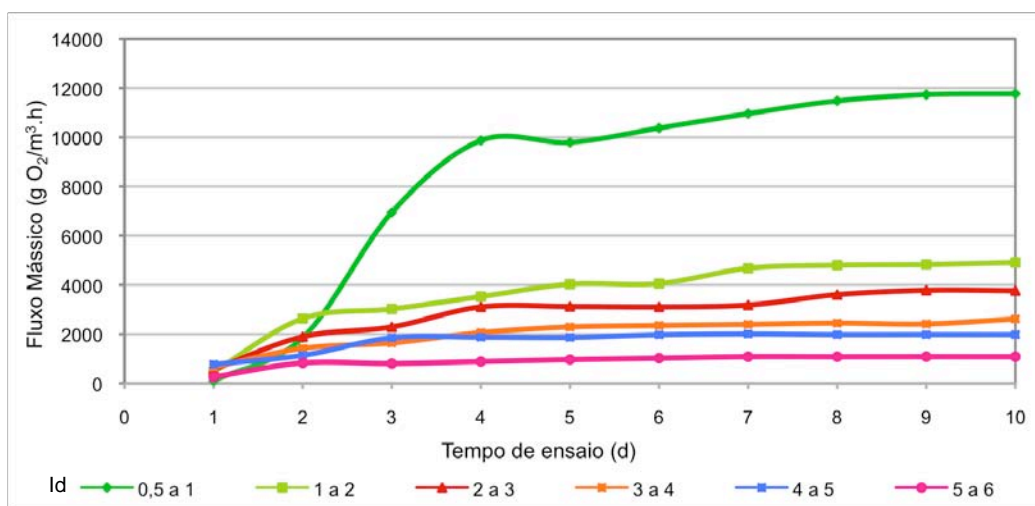


Figura 89 – Fluxo mássico, por unidade de volume de biofilme, ao longo do tempo de ensaio, para as idades de biofilme analisadas. – Fluxos mássicos calculados através de valores expressos em CQO ( $\text{g O}_2 / \text{m}^3.\text{h}$ ) – Fase 2

Conforme se pode verificar, o comportamento é semelhante ao anteriormente descrito, isto é, para a Fase 2, a idade de biofilme mais baixa (entre 0,5 e 1 dia) é a que conduz a um fluxo mássico mais elevado, tanto por unidade de área, como por unidade de volume de biofilme.



Com as Figuras 90 e 91, apresenta-se uma análise semelhante para a Fase 3, constatando-se que ao contrário da Fase 2, não se observam dois conjuntos de idades de biofilme com estabilização em patamares diferentes, verificando-se que aquela ocorre praticamente a tempos de ensaio semelhantes.

Assim, a influência da idade do biofilme no processo de degradação surge muito mais evidente para a concentração de substrato mais baixa, ou seja, de 500 mgO<sub>2</sub>/l – CQO.

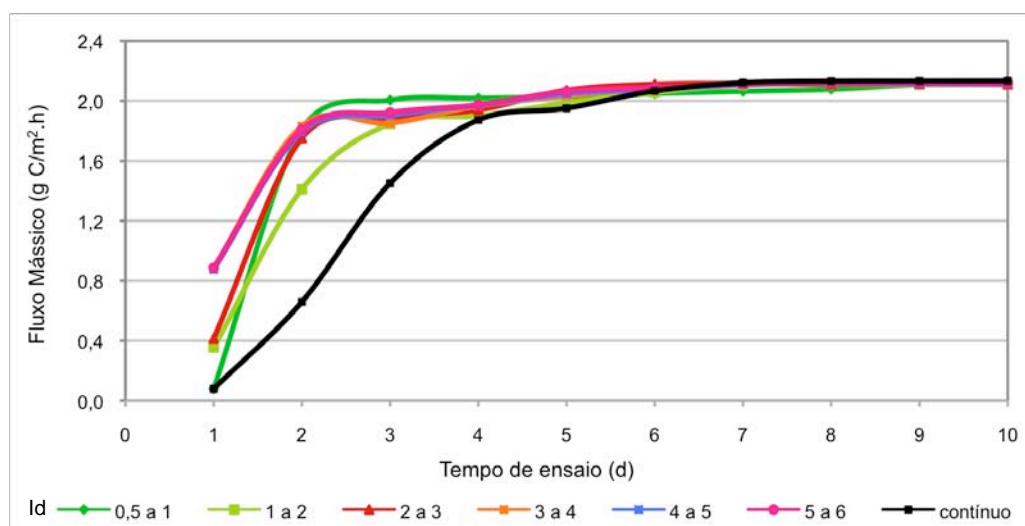


Figura 90 – Fluxo mássico, por unidade de área, ao longo do tempo de ensaio, para as idades de biofilme analisadas. - Fluxos mássicos calculados através de valores expressos em DOC – Fase 3.

Conforme se pode verificar através da Figura 91, com os valores de concentração de substrato determinadas com CQO, o comportamento é semelhante ao anteriormente referido, respeitante aos valores de DOC.

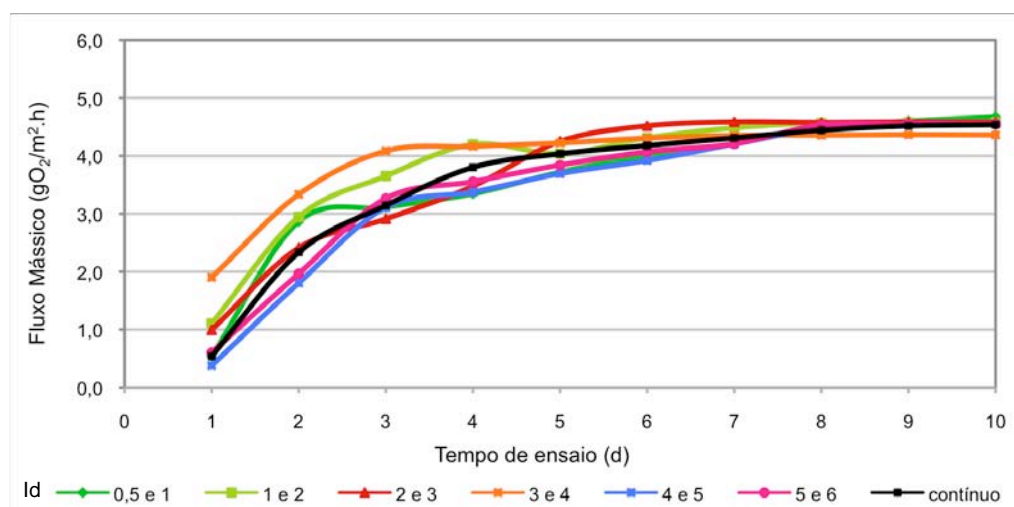


Figura 91 – Fluxo mássico, por unidade de área, ao longo do tempo de ensaio, para as idades de biofilme analisadas. – Fluxos mássicos calculados através de valores expressos em CQO - Fase 3

Nas Figuras 92 e 93 mostram-se os resultados obtidos, com DOC e com CQO, respectivamente, para a variação do fluxo mássico por unidade de volume de biofilme ao longo do tempo de ensaio, para as várias idades de biofilme estudadas, durante a Fase 3, constatando-se um comportamento semelhante ao da Fase 2, ou seja, a idade de biofilme 0,5 – 1 dia é a que conduz ao fluxo mássico mais elevado.

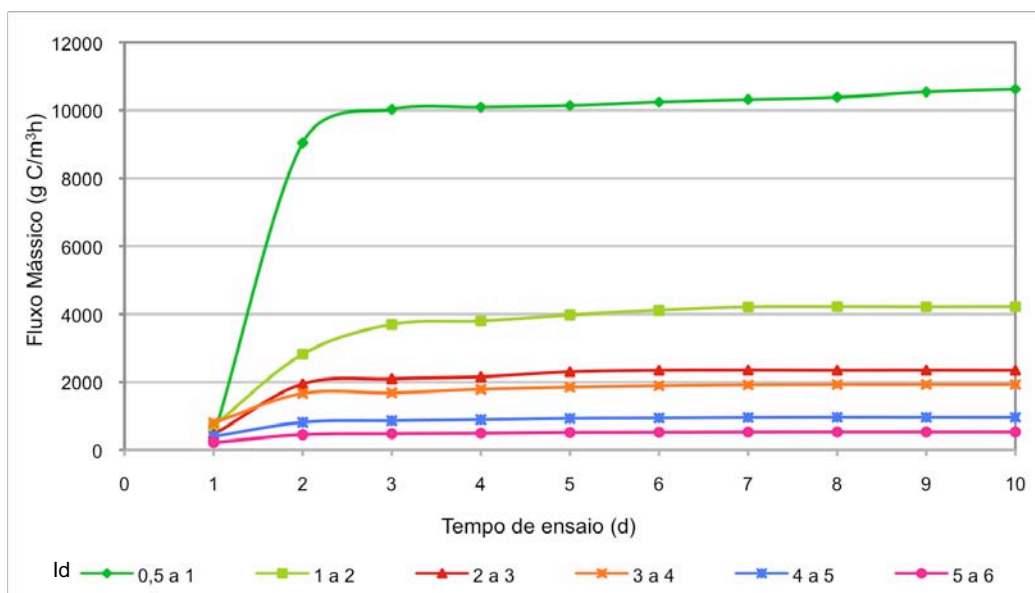


Figura 92 – Fluxo mássico, por unidade de volume de biofilme, ao longo do tempo de ensaio, para as idades de biofilme analisadas. – Fluxos mássicos calculados através de valores expressos em DOC ( $\text{g C} / \text{m}^3 \cdot \text{h}$ ) – Fase 3.

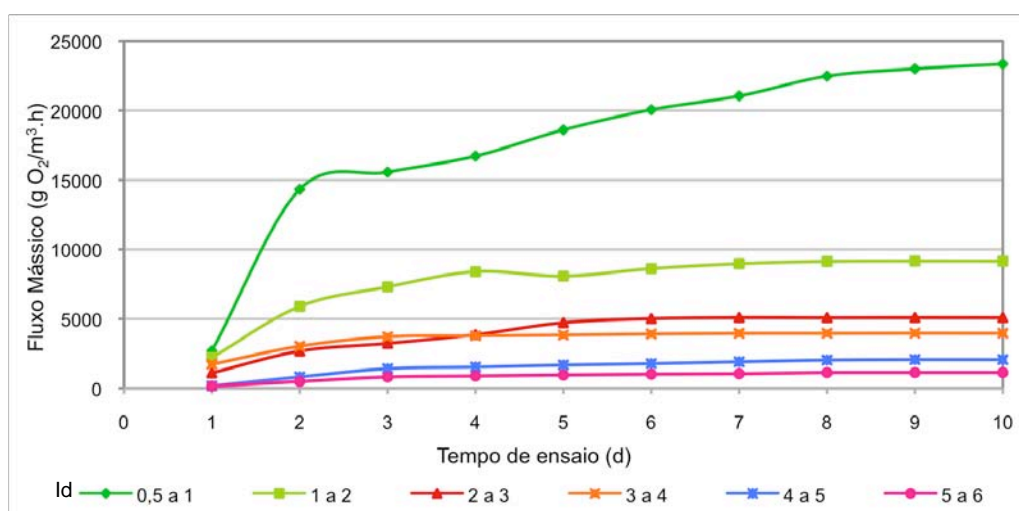


Figura 93 – Fluxo mássico, por unidade de volume de biofilme, ao longo do tempo de ensaio, para as idades de biofilme analisadas. – Fluxos mássicos calculados através de valores expressos em CQO ( $\text{g O}_2 / \text{m}^3 \cdot \text{h}$ ) – Fase 3.

Nas Figuras 94 a 113 comparam-se os valores de fluxo mássico por unidade de área ( $\text{gC/m}^2\cdot\text{h}$  e  $\text{gO}_2/\text{m}^2\cdot\text{h}$ ), através dos resultados registados em DOC e em CQO respectivamente, para cada idade de biofilme estudada e para cada dia de ensaio durante a Fase 2.

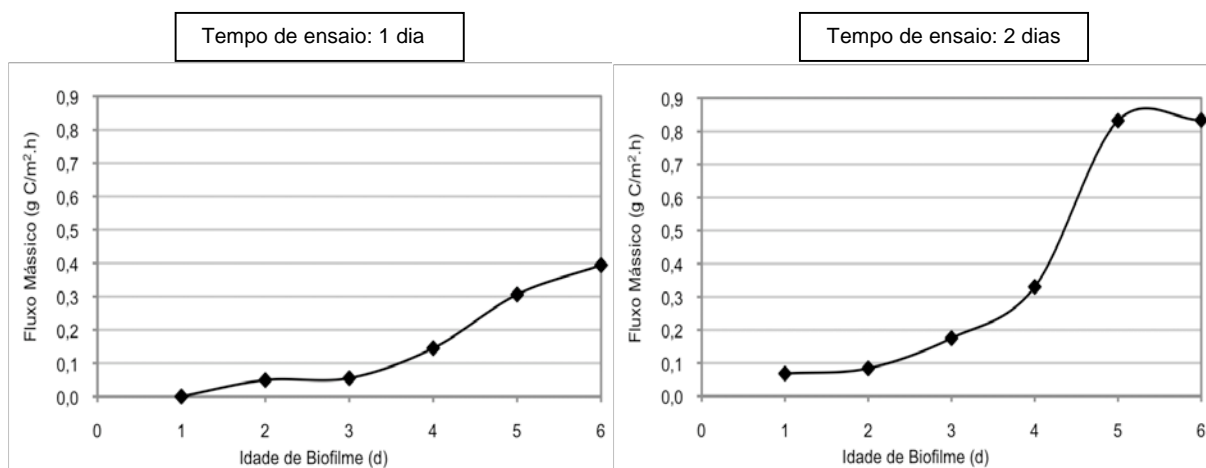


Figura 94 - Fluxo mássico por unidade de área (DOC) para as idades de biofilme estudadas e para o 1º dia de ensaio – Fase 2

Figura 95 - Fluxo mássico por unidade de área (DOC) para as idades de biofilme estudadas e para o 2º dia de ensaio – Fase 2

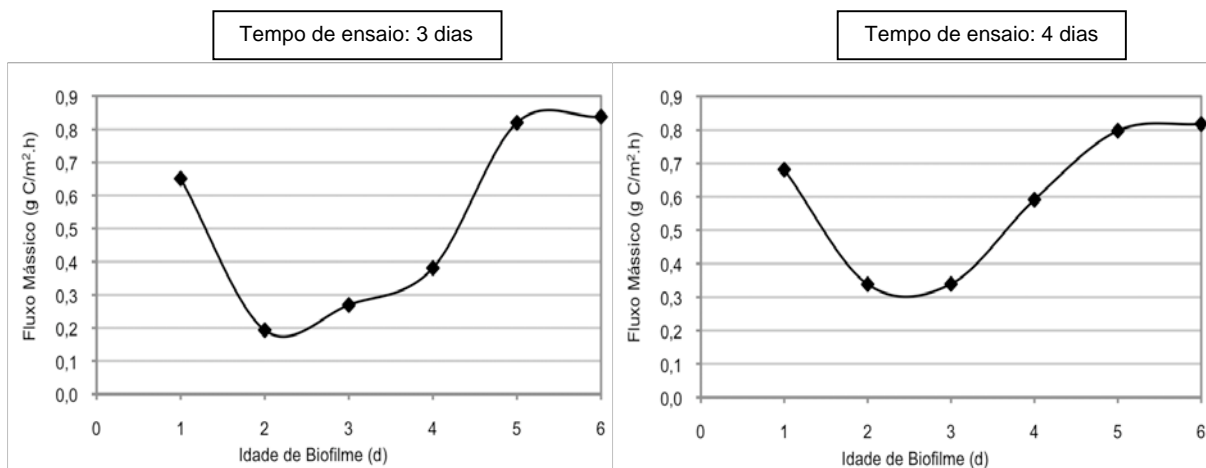


Figura 96 - Fluxo mássico por unidade de área (DOC) para as idades de biofilme estudadas e para o 3º dia de ensaio – Fase 2

Figura 97 - Fluxo mássico por unidade de área (DOC) para as idades de biofilme estudadas e para o 4º dia de ensaio – Fase 2

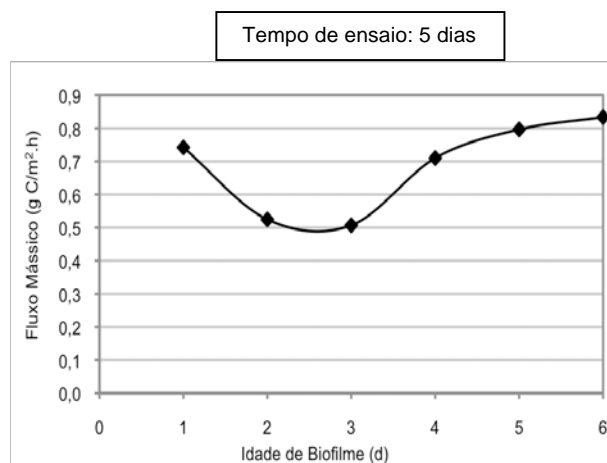


Figura 98 - Fluxo mássico por unidade de área (DOC) para as idades de biofilme estudadas e para o 5º dia de ensaio – Fase 2

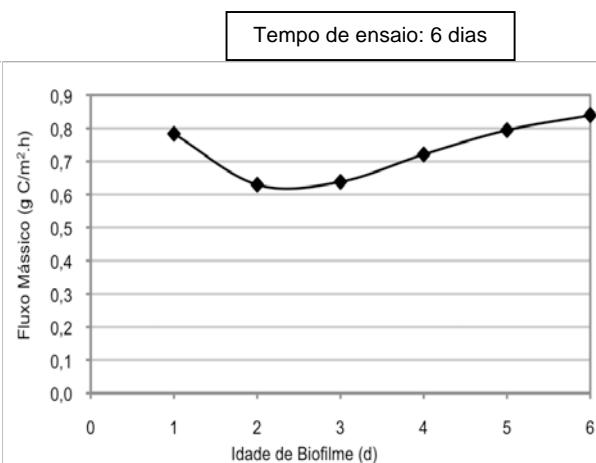


Figura 99 - Fluxo mássico por unidade de área (DOC) para as idades de biofilme estudadas e para o 6º dia de ensaio – Fase 2

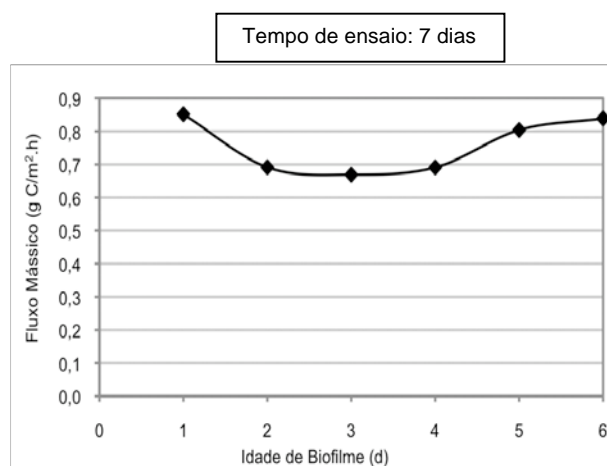


Figura 100 - Fluxo mássico por unidade de área (DOC) para as idades de biofilme estudadas e para o 7º dia de ensaio – Fase 2

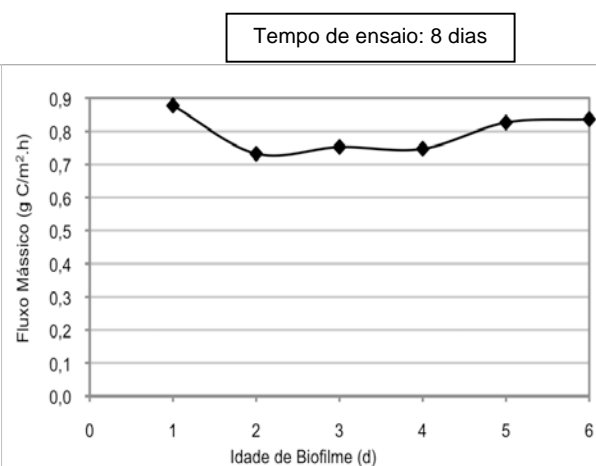


Figura 101 - Fluxo mássico por unidade de área (DOC) para as idades de biofilme estudadas e para o 8º dia de ensaio – Fase 2

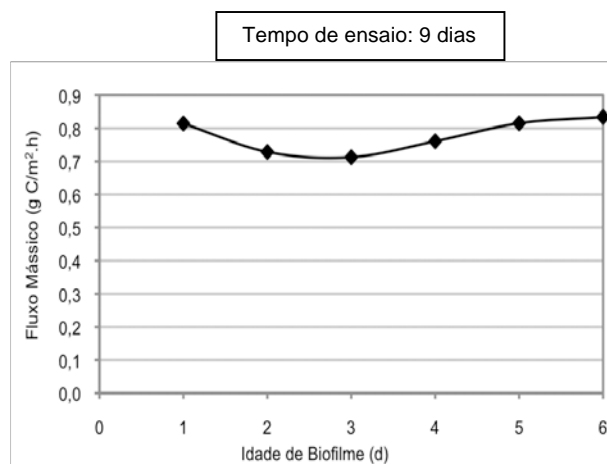


Figura 102 - Fluxo mássico por unidade de área (DOC) para as idades de biofilme estudadas e para o 9º dia de ensaio – Fase 2

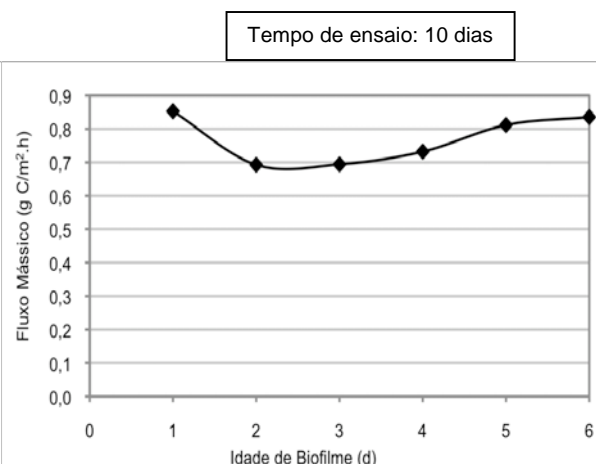


Figura 103 - Fluxo mássico por unidade de área (DOC) para as idades de biofilme estudadas e para o 10º dia de ensaio – Fase 2

Nas Figuras 104 a 113 mostra-se uma análise semelhante à efectuada nas Figuras 94 a 103, para os resultados obtidos com CQO, Fase 2.

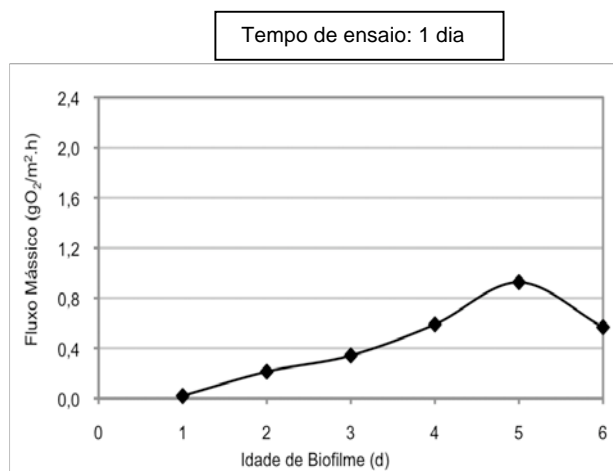


Figura 104 - Fluxo mássico por unidade de área (CQO) para as idades de biofilme estudadas e para o 1º dia de ensaio – Fase 2

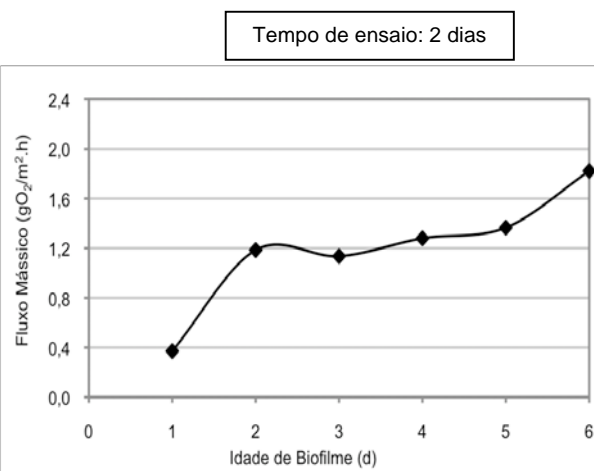


Figura 105 - Fluxo mássico por unidade de área (CQO) para as idades de biofilme estudadas e para o 2º dia de ensaio – Fase 2

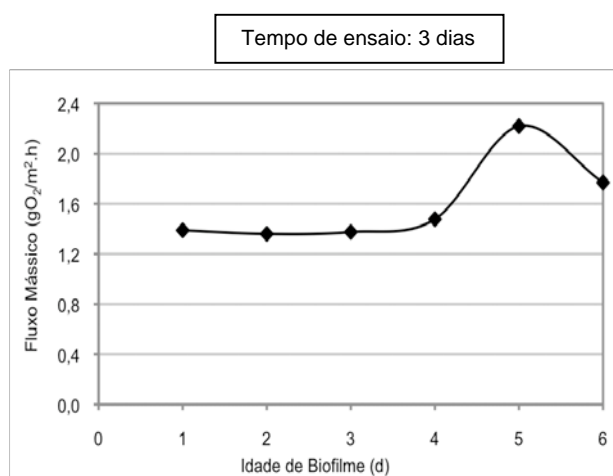


Figura 106 - Fluxo mássico por unidade de área (CQO) para as idades de biofilme estudadas e para o 3º dia de ensaio – Fase 2

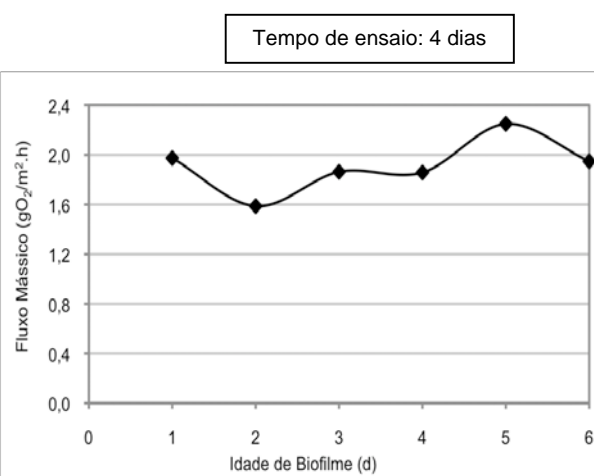


Figura 107 - Fluxo mássico por unidade de área (CQO) para as idades de biofilme estudadas e para o 4º dia de ensaio – Fase 2

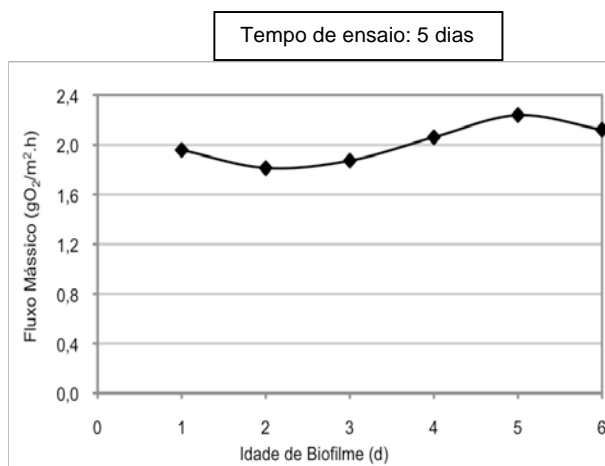


Figura 108 - Fluxo mássico por unidade de área (CQO) para as idades de biofilme estudadas e para o 5º dia de ensaio – Fase 2

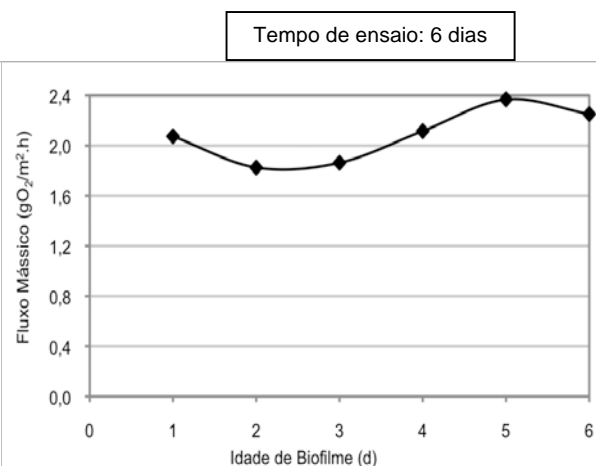


Figura 109 - Fluxo mássico por unidade de área (CQO) para as idades de biofilme estudadas e para o 6º dia de ensaio – Fase 2

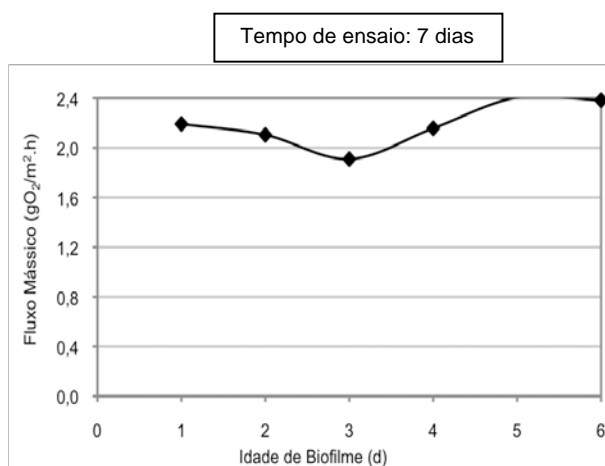


Figura 110 - Fluxo mássico por unidade de área (CQO) para as idades de biofilme estudadas e para o 7º dia de ensaio – Fase 2

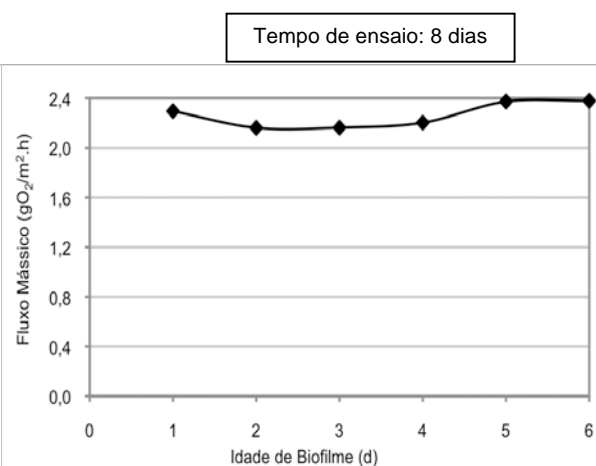


Figura 111 - Fluxo mássico por unidade de área (CQO) para as idades de biofilme estudadas e para o 8º dia de ensaio – Fase 2

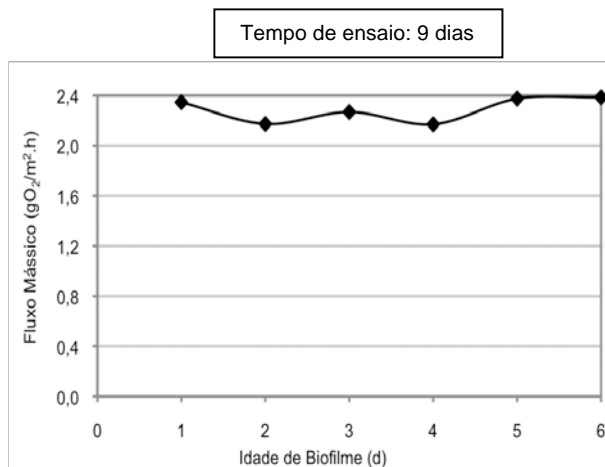


Figura 112 - Fluxo mássico por unidade de área (CQO) para as idades de biofilme estudadas e para o 9º dia de ensaio – Fase 2

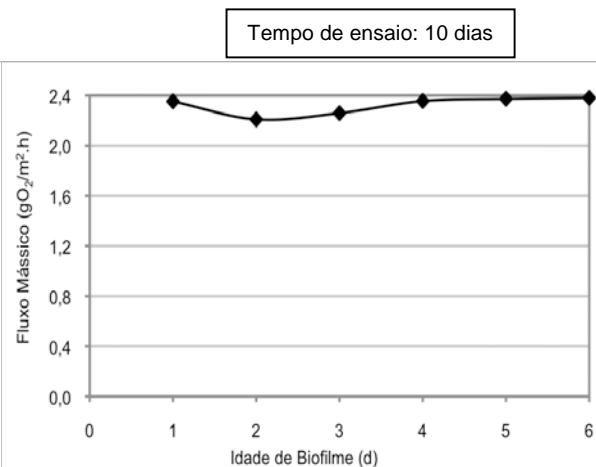


Figura 113 - Fluxo mássico por unidade de área (CQO) para as idades de biofilme estudadas e para o 10º dia de ensaio – Fase 2

Nas Figuras 114 a 133 mostram-se os valores de fluxo mássico por unidade de área ( $\text{gC/m}^2\cdot\text{h}$  e  $\text{gO}_2/\text{m}^2\cdot\text{h}$ ) obtidos com DOC e CQO, respectivamente, para cada idade de biofilme estudada e para cada dia de ensaio, durante a Fase 3.

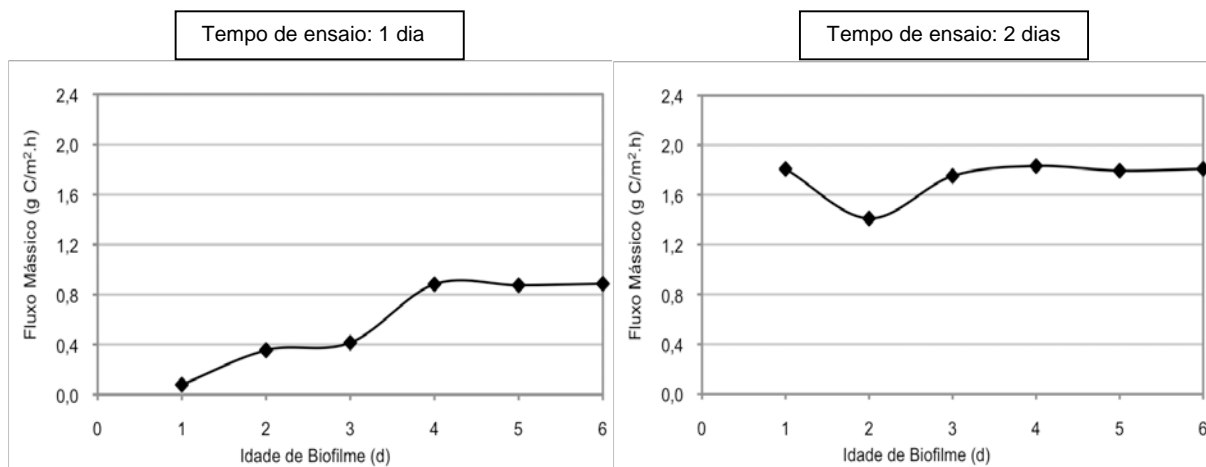


Figura 114 - Fluxo mássico por unidade de área (DOC) para as idades de biofilme estudadas e para o 1º dia de ensaio – Fase 3

Figura 115 - Fluxo mássico por unidade de área (DOC) para as idades de biofilme estudadas e para o 2º dia de ensaio – Fase 3

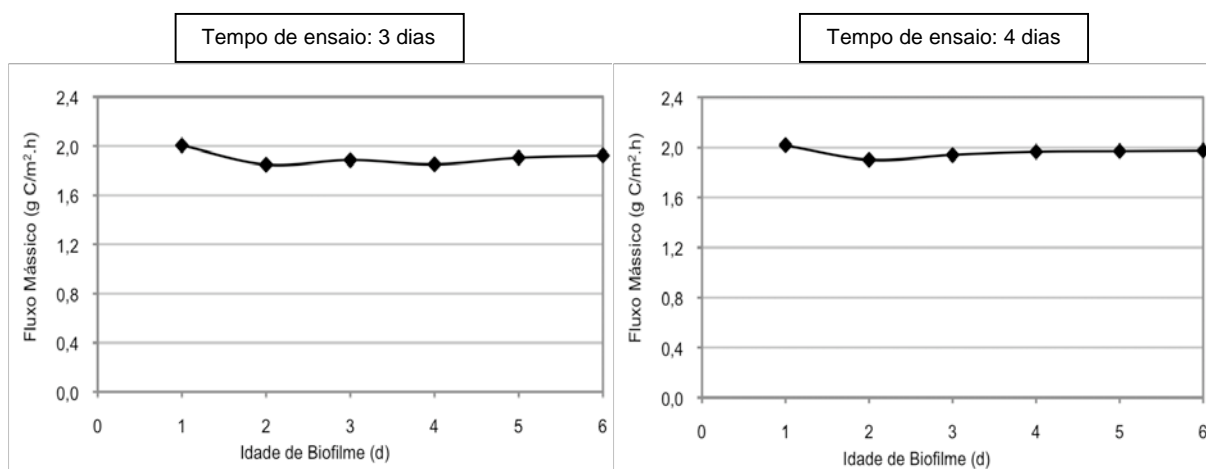


Figura 116 - Fluxo mássico por unidade de área (DOC) para as idades de biofilme estudadas e para o 3º dia de ensaio – Fase 3

Figura 117 - Fluxo mássico por unidade de área (DOC) para as idades de biofilme estudadas e para o 4º dia de ensaio – Fase 3

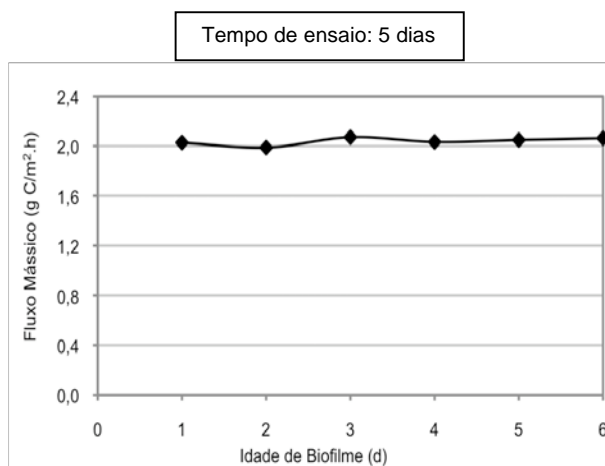


Figura 118 - Fluxo mássico por unidade de área (DOC) para as idades de biofilme estudadas e para o 5º dia de ensaio – Fase 3

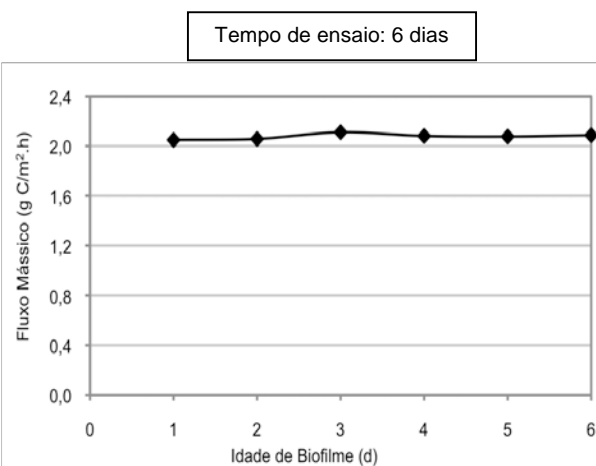


Figura 119 - Fluxo mássico por unidade de área (DOC) para as idades de biofilme estudadas e para o 6º dia de ensaio – Fase 3

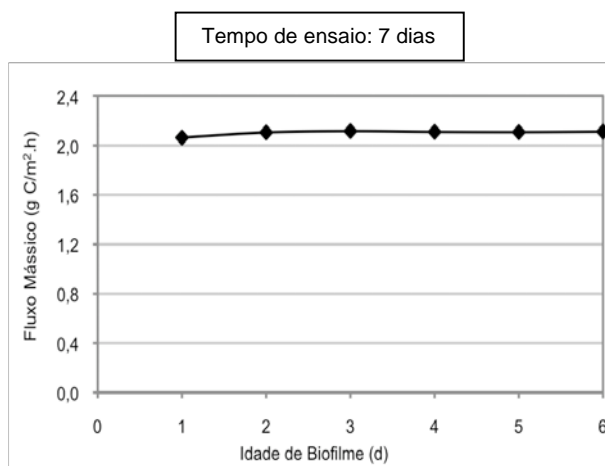


Figura 120 - Fluxo mássico por unidade de área (DOC) para as idades de biofilme estudadas e para o 7º dia de ensaio – Fase 3

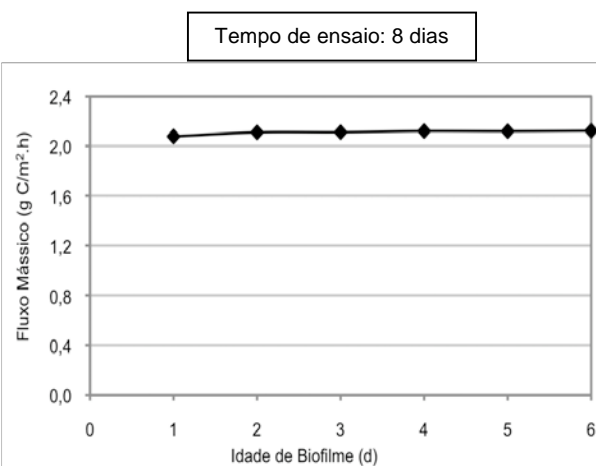


Figura 121 - Fluxo mássico por unidade de área (DOC) para as idades de biofilme estudadas e para o 8º dia de ensaio – Fase 3

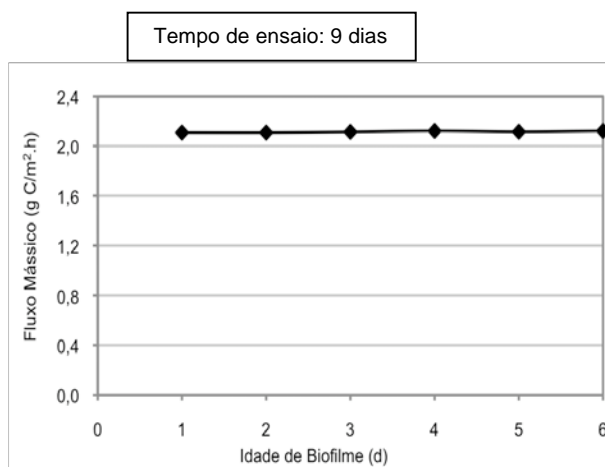


Figura 122 - Fluxo mássico por unidade de área (DOC) para as idades de biofilme estudadas e para o 9º dia de ensaio – Fase 3

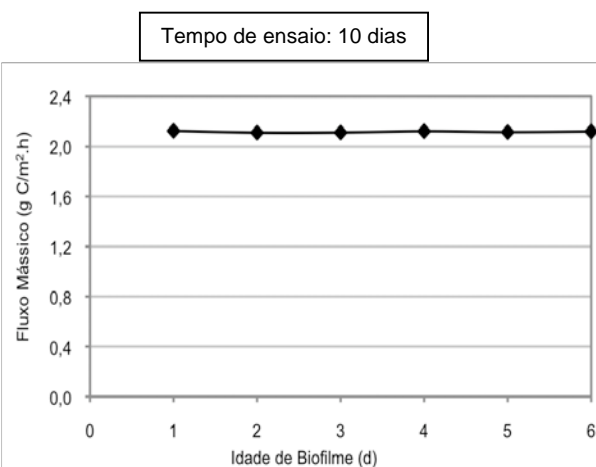


Figura 123 - Fluxo mássico por unidade de área (DOC) para as idades de biofilme estudadas e para o 10º dia de ensaio – Fase 3



Nas Figuras 124 a 133 mostra-se uma análise semelhante à efectuada nas Figuras 114 a 123, para os resultados obtidos com CQO, Fase 3.

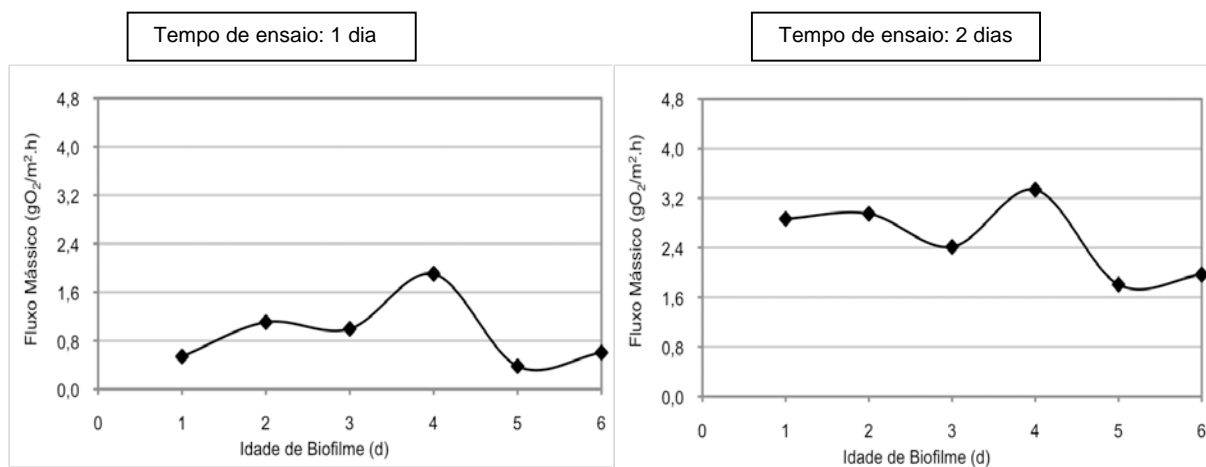


Figura 124 - Fluxo mássico por unidade de área (CQO) para as idades de biofilme estudadas e para o 1º dia de ensaio – Fase 3

Figura 125 - Fluxo mássico por unidade de área (CQO) para as idades de biofilme estudadas e para o 2º dia de ensaio – Fase 3

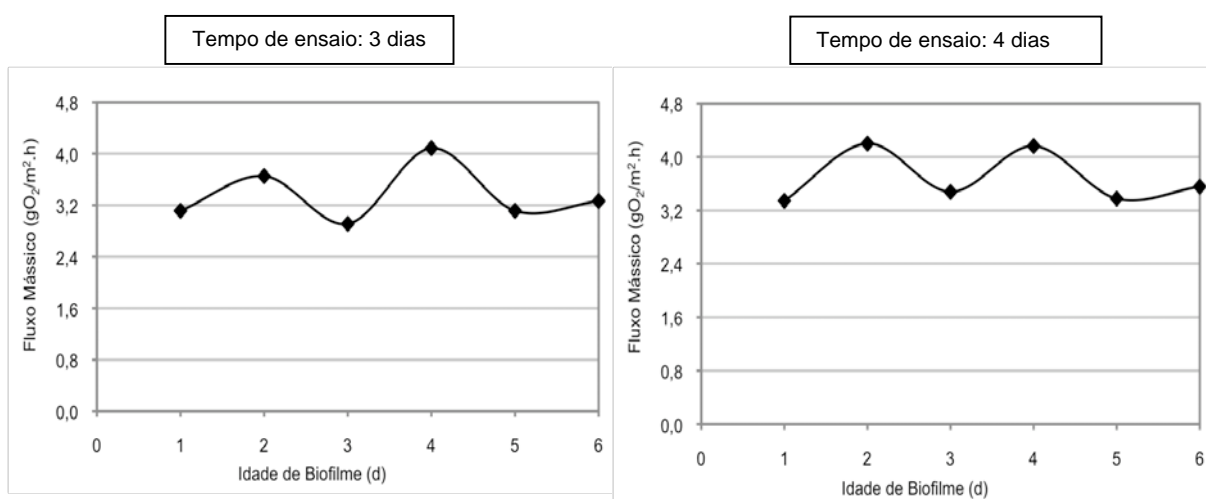


Figura 126 - Fluxo mássico por unidade de área (CQO) para as idades de biofilme estudadas e para o 3º dia de ensaio – Fase 3

Figura 127 - Fluxo mássico por unidade de área (CQO) para as idades de biofilme estudadas e para o 4º dia de ensaio – Fase 3

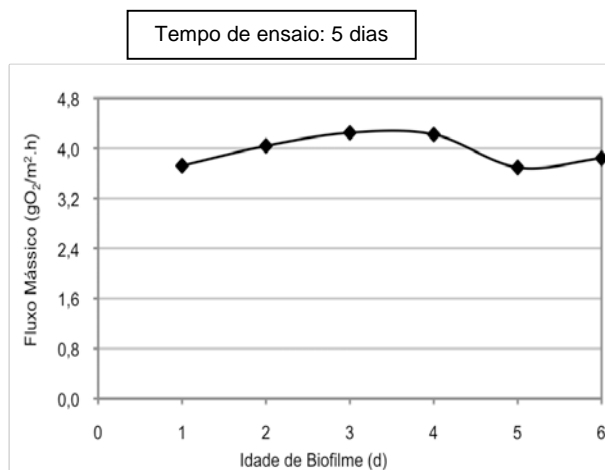


Figura 128 - Fluxo mássico por unidade de área (CQO) para as idades de biofilme estudadas e para o 5º dia de ensaio – Fase 3

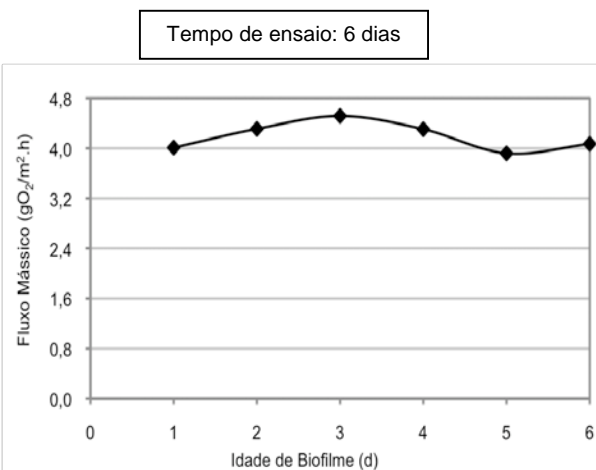


Figura 129 - Fluxo mássico por unidade de área (CQO) para as idades de biofilme estudadas e para o 6º dia de ensaio – Fase 3

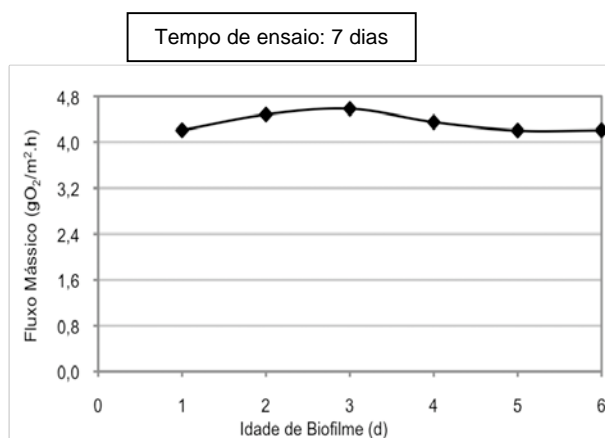


Figura 130 - Fluxo mássico por unidade de área (CQO) para as idades de biofilme estudadas e para o 7º dia de ensaio – Fase 3

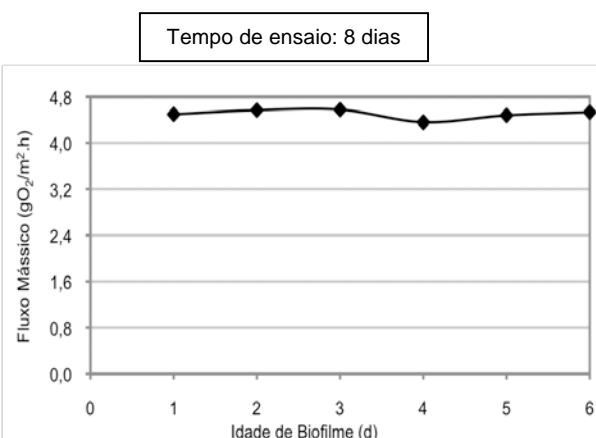


Figura 131 - Fluxo mássico por unidade de área (CQO) para as idades de biofilme estudadas e para o 8º dia de ensaio – Fase 3

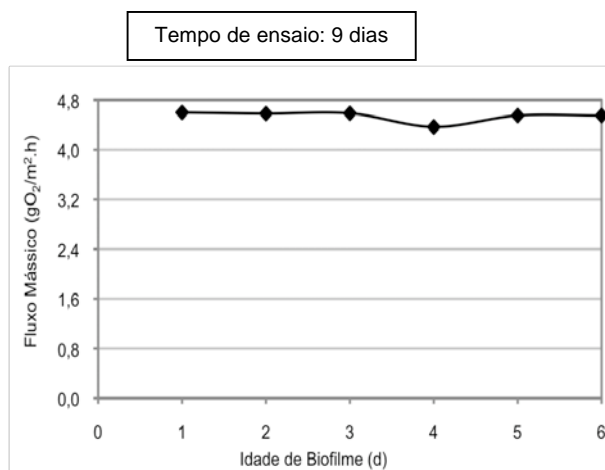


Figura 132 - Fluxo mássico por unidade de área (CQO) para as idades de biofilme estudadas e para o 9º dia de ensaio – Fase 3

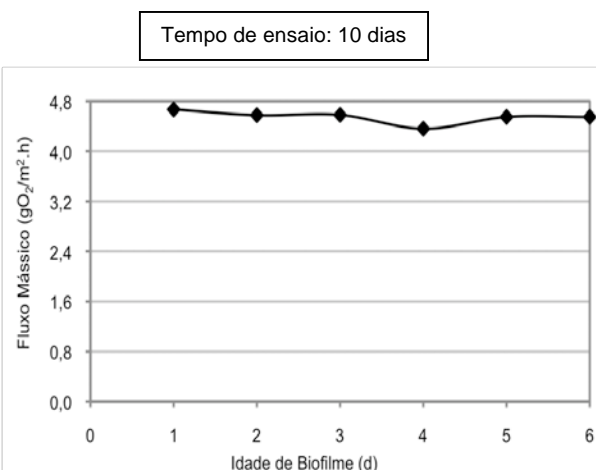


Figura 133 - Fluxo mássico por unidade de área (CQO) para as idades de biofilme estudadas e para o 10º dia de ensaio – Fase 3

Com os resultados da Fase 3 pode observar-se que a partir do quarto dia de ensaio, os valores do fluxo mássico são semelhantes para todas as idades de biofilme.

Expressando os fluxos mássicos com CQO, verifica-se que os respectivos valores assumem a mesma ordem de grandeza a partir do sexto dia. No entanto, e à semelhança da Fase 2, no final dos ensaios os valores de fluxo mássico por unidade de área mais elevados foram registados para as idades de biofilme 4 - 5 dias e 5 - 6 dias e para a idade de biofilme 0,5 - 1 dia.

Diversos estudos (de Beer *et al.*, 1994, Stewart, 1993, Costerton *et al.*, 1994 e Stewart, 2003) indicam que a difusão de oxigénio e substrato em biofilmes apenas se verifica, fundamentalmente, ao nível da colónia de microrganismos, isto é, admitindo que todo o biofilme é atravessado por canais, micrométricos, que transportam oxigénio e nutrientes, e que portanto as limitações por difusão ocorrem apenas no interior da colónia. Apesar das virtualidades desta interpretação, considerou-se que para o presente estudo poderia ser esclarecedor analisar a variação do módulo de Thiele (pressupondo uma cinética de primeira ordem), para as diferentes condições experimentais utilizadas, nomeadamente a influência da idade do biofilme na cinética de biodegradação de um substrato orgânico, com espessuras aproximadamente constantes de biofilme.

Assim, considerando o Módulo de Thiele ( $\Phi$ ),

$$\Phi = \delta \times \sqrt{\frac{rA}{G \times S^*}} \quad (\text{eq. 22})$$

sendo:  $\delta$  - Espessura do biofilme (L)

$rA$  – Fluxo mássico por unidade de área de biofilme ( $\text{M L}^{-2} \text{T}^{-1}$ )

$G$  – Coeficiente de difusão da glucose em água –  $1,5 \times 10^{-6} (\text{L}^2 \text{T}^{-1})$

$S^*$  - Concentração de substrato na interface biofilme / líquido ( $\text{M L}^{-3}$ )

No Quadro 25 mostram-se as concentrações adoptadas do regime quase estacionário ( $S^*$ ), utilizadas para o cálculo do Módulo de Thiele. As concentrações são apresentadas em  $\text{gC} / \text{m}^3$  - DOC e em  $\text{gO}_2/\text{m}^3$  – CQO, para as Fases 2 e 3.

Quadro 25 – Valores de  $S^*$  utilizados para cálculo do Módulo de Thiele

Idade de Biofilme (d)	S* - DOC (mg C/l)		S* - CQO (mg O <sub>2</sub> /l)	
	Fase 2	Fase 3	Fase 2	Fase 3
0,5 a 1	76	126	82	155
1 a 2	105	128	108	172
2 a 3	104	128	99	171
3 a 4	95	126	100	177
4 a 5	83	127	78	177
5 a 6	79	127	77	180

No Quadro 26, apresentam-se os valores dos fluxos mássicos por unidade de área, calculados com os valores de  $S^*$  e que foram utilizados para obter o módulo de Thiele.

Quadro 26 – Valores dos fluxos mássicos por unidade de área ( $r_A$ ), utilizados para cálculo do Módulo de Thiele.

Idade de Biofilme (d)	$r_A$ - (g C/m <sup>2</sup> .h)		$r_A$ - (g O <sub>2</sub> /m <sup>2</sup> .h)	
	Fase 2	Fase 3	Fase 2	Fase 3
0,5 a 1	0,852	2,124	2,353	4,669
1 a 2	0,692	2,110	2,209	4,577
2 a 3	0,694	2,111	2,259	4,582
3 a 4	0,732	2,121	2,356	4,361
4 a 5	0,811	2,114	2,373	4,549
5 a 6	0,835	2,119	2,380	4,549

Na Figura 134, mostram-se os valores de espessura das Fases 2 e 3 registados, que foram utilizados no cálculo do Módulo de Thiele.

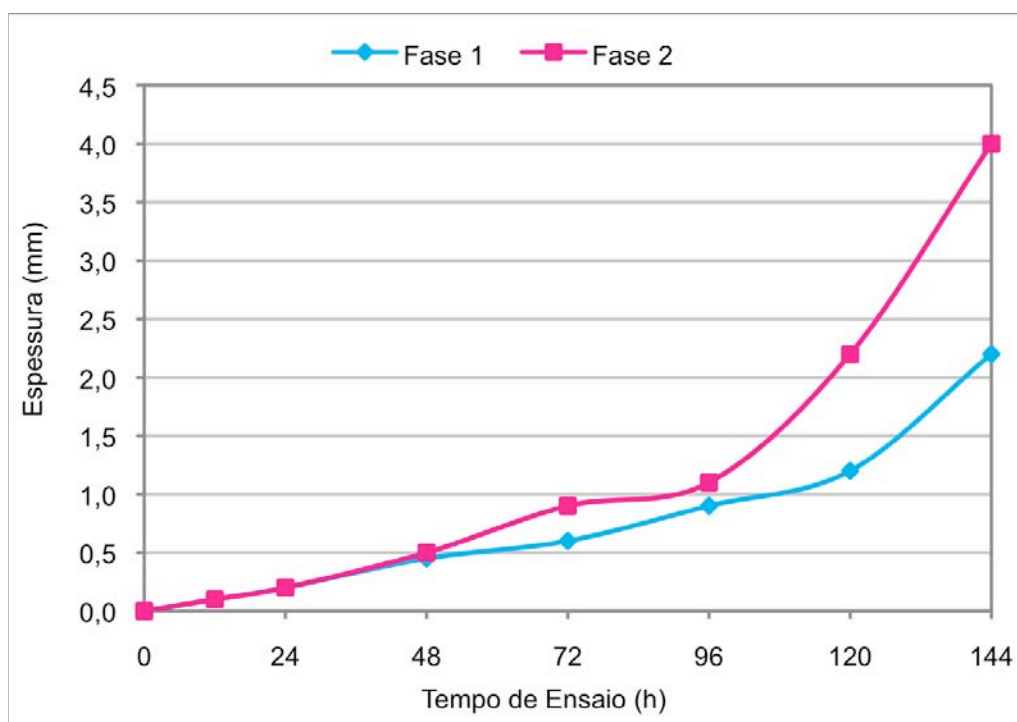


Figura 134 – Evolução da espessura do biofilme ao longo do tempo de ensaio, Fases 2 e 3.

Nas Figuras 135 a 138 representa-se a variação do Módulo de Thiele com a idade do biofilme e para as Fases 2 e 3. Os valores do módulo de Thiele foram calculados utilizando os valores obtidos com DOC e com CQO.

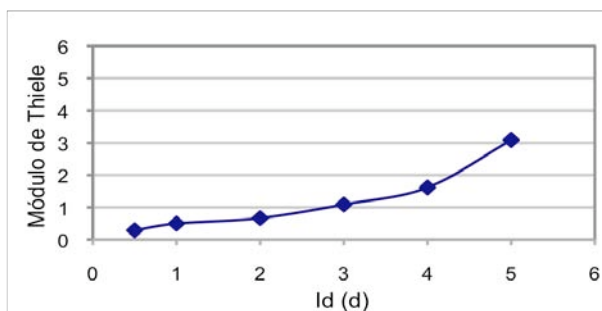


Figura 135 – Módulo de Thiele obtido para as idades de biofilme estudadas, para a Fase 2 – DOC

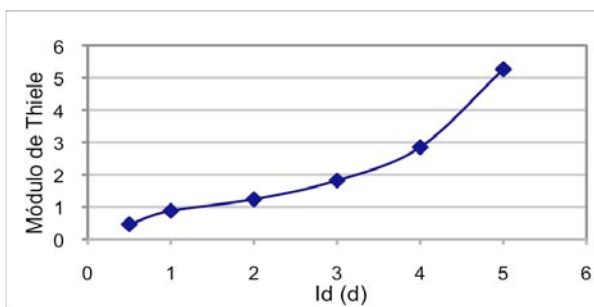
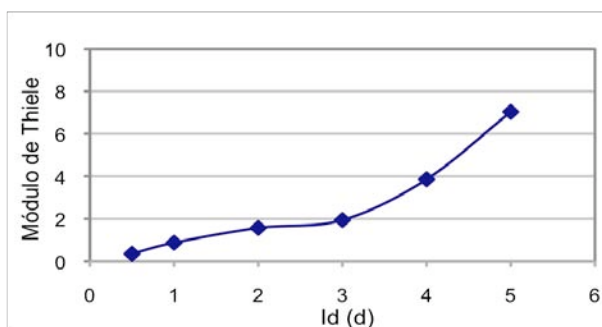
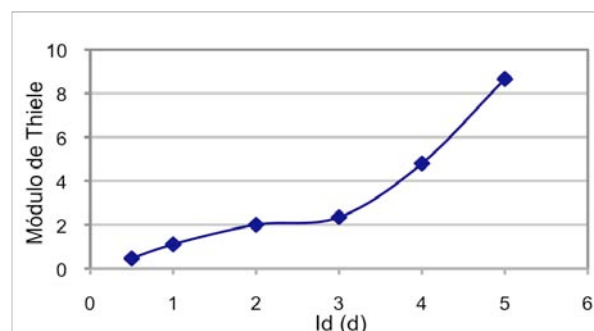


Figura 136 – Módulo de Thiele obtido para as idades de biofilme estudadas, para a Fase 2 – CQO



Figuras 137 – Módulo de Thiele obtido para as idades de biofilme estudadas, para a Fase 3 – DOC



Figuras 138 – Módulo de Thiele obtido para as idades de biofilme estudadas, para a Fase 3 – CQO

Como se pode verificar, e como seria de esperar, quanto maior é a espessura, maior é o módulo de Thiele, devendo, consequentemente, ser mais importante a limitação de difusão de substrato no biofilme.

Segundo Santana (1986), para valores de Módulo de Thiele superiores a 1,40 (com  $S^*$  expresso em CQO), reduz-se o factor de eficiência, pelo que para os ensaios da Fase 2 com idades de biofilme superiores a 2 - 3 dias deverão existir limitações por difusão. Da mesma forma, e utilizando o mesmo critério para a Fase 3, em todas as idades de biofilme existiriam limitações de difusão de substrato, com excepção das duas idades menores (Id 0,5 a 1 dia e Id 1 a 2 dias).

Contudo, e analisando os valores de fluxo mássico, verificou-se que embora nas idades de biofilme mais elevadas (entre 4 e 5 dias e entre 5 e 6 dias) se possa verificar uma situação de filme parcialmente penetrado (colónias maiores e por isso não totalmente penetradas), os respectivos fluxos mássicos são mais elevados e estabilizam mais cedo do que nas restantes idades estudadas, com excepção da idade de biofilme menor, onde foi registado um comportamento em tudo semelhante, sendo até, nalguns casos, mais eficiente.

De facto, analisando os resultados obtidos, poder-se-á concluir que um biofilme extremamente jovem, com uma idade entre 0,5 e 1 dia, poderá ser mais eficiente do que os biofilmes de idade superior, pelo que se pode admitir que haja vantagens, para a operação deste tipo de reactores biológicos, em limitar o crescimento do biofilme, passando dessa forma a ser um processo de espessura controlada e, conseqüentemente, com ganhos de eficiência.

Para determinação do tipo de regime de escoamento foi calculado o número de Reynolds, tendo-se obtido um valor muito inferior a 2000, o que indicia que no reactor o regime é próximo do laminar.

## 6. Discussão

Com o presente trabalho, introduziu-se o conceito de idade de biofilme, inspirado no parâmetro de controlo de sistemas de biomassa em suspensão, idade de lamas (tempo de residência de sólidos).

Até aqui, o controlo da quantidade de biomassa em sistemas de biomassa fixa não se tem colocado, porquanto se assume que aquela quantidade será sempre a máxima que se mantiver aderente a um suporte, sendo limitada por condições de difusão de substratos (orgânico ou oxigénio) e, ou de atrito entre fases, sólida e líquida.

Nestas circunstâncias, na operação de sistemas de biomassa fixa tem-se presumido que o biofilme tem as características que o sistema “naturalmente” permite, declinando-se a possibilidade do respectivo controlo. Note-se, por outro lado, que mesmo em trabalhos de investigação sobre biofilmes, que como anteriormente referido se têm socorrido de sofisticação diversa para a sua avaliação, desconhece-se que algum tivesse incidido na análise do seu comportamento para uma dada gama de espessuras constantes no tempo. Esses estudos, embora medindo a espessura, avaliam comportamentos relativos a estados pontuais do desenvolvimento contínuo do biofilme.

Nesta perspectiva, o presente trabalho propôs um sistema inovador que permite analisar aqueles comportamentos, praticamente, para qualquer espessura de biofilme que se pretenda. É assim que o conceito de idade de biofilme se materializa, na medida em que à operação a uma dada espessura se associa determinada biomassa resultante de um tempo de crescimento pré-fixado, afinal uma “idade”.

Os resultados permitiram comparar o comportamento de biofilmes de diferentes idades obtidos a partir de duas concentrações de um substrato orgânico, tendo-se observado diferenças significativas.

Na Fase 2 de ensaios, constatou-se que a partir do oitavo dia o regime próximo do estacionário foi atingido em todas as experiências, reduzindo-se para seis dias nas experiências com a idade de biofilme mais elevada (entre 4 e 5 dias e entre 5 e 6 dias) e na experiência com a menor idade do biofilme (entre 0,5 e 1 dia). Contudo, na Fase 3 de ensaios, aquele regime foi atingido logo a partir do quarto dia em todas as experiências. Constatou-se assim, uma influência clara da concentração de substrato, que poderá ser consequência da maior abundância de substrato, ter acelerado condições de adaptação da biomassa (Button, 1985, de Beer, *et al.*, 2006).

A esta eventual adaptação mais célere correspondeu, como seria de esperar, que na descrição dos ensaios através da evolução dos fluxos mássicos degradados, por unidade de área ou de volume, os respectivos valores máximos fossem também atingidos mais cedo.

Para a concentração de substrato mais elevada, Fase 3, a observação anterior foi bastante menos nítida, embora pela análise do fluxo mássico por unidade de volume, referente à idade de biofilme mais jovem, se tenha verificado que foi substancialmente superior às restantes idades analisadas.

Considera-se que estas observações poderão resultar (Chang, *et al.*, 2003, Motlagh, *et al.*, 2006, Wolf, *et al.*, 2007, Rittmann *et al.*, 2004 e Huston *et al.*, 1998) de, para a menor idade do biofilme, existir uma disponibilidade total de substrato para a biomassa existente, não se verificando fenómenos de inibição e, ou outras limitações, nomeadamente fenómenos de competição, predação, inibição por produtos ou mesmo de difusão de nutrientes ou oxigénio (Wolf, *et al.*, 2007, Noguera e Morgenroth, 2004, Wanner e Morgenroth, 2004 e Pizarro *et al.*, 2004). Embora admitindo que tais fenómenos também estarão presentes nas idades mais elevadas, isto é, para as idades de biofilme entre 4 e 5 dias e 5 e 6 dias, podendo influenciar negativamente a eficiência dos processos de degradação, poderão ser “mascarados” pelo simples facto de nas referidas idades a quantidade de biomassa presente ser significativamente maior do que nas restantes, havendo portanto uma compensação. Por outro lado, e segundo Chaudhry e Beg (1998) e Yoon *et al.* (1977), os biofilmes que se encontrem em estado estacionário são menos afectados por estes processos de inibição, nomeadamente processos de competição e predação, normalmente associados a fenómenos de alternância de espécies. Neste processo, algumas espécies são naturalmente eliminadas e as que subsistem, e que constituem o biofilme, conseguem coexistir, tornando o processo estável. Esta circunstância poderá explicar as elevadas eficiências registadas para as idades de biofilme entre 4 e 5 dias e entre 5 e 6 dias, uma vez que foi também nestas idades que a estabilização foi atingida mais rapidamente.

Parece assim poder admitir-se que haverá vantagem em explorar os sistemas de biomassa fixa com idades de biofilme muito jovens (entre 0,5 e 1) ou superiores a 4 dias, sendo, como observado, os efeitos mais sensíveis a baixas ou médias concentrações de substrato.

Embora seja aceite que todo o biofilme é atravessado por canais que transportam nutrientes e oxigénio (Stewart, 2003) e que os fenómenos de limitação por difusão se verificam, principalmente, ao nível da colónia de microrganismos, considerou-se que seria interessante analisar as possíveis variações do Módulo de Thiele nas diferentes situações estudadas, por forma a poder estimar eventuais limitações daquele tipo, assimilando o biofilme a uma estrutura plana, conforme as interpretações convencionais.



Assim, nos Quadros 27 e 28 indicam-se os valores do Módulo de Thiele para os ensaios realizados, a duas concentrações, tendo-se adoptado uma metodologia para interpretação dos resultados que, embora especulativa, disponibiliza uma observação interessante sobre o comportamento de biofilmes de determinada idade, em resultado do correspondente crescimento.

A metodologia baseia-se em admitir que as características da camada exterior do biofilme se repetem para a mesma unidade de tempo, obtendo-se a respectiva espessura por diferença entre a espessura total (observada) e a que se verificou no período de tempo anterior. Deste modo, conhecendo-se o comportamento global do biofilme, por balanço material inferiu-se o comportamento da camada interior.

Quadro 27 – Análise do comportamento do biofilme,  $S_0 = 500 \text{ mg O}_2/\text{l}$

Id (dia)	Camada								
	interna			externa			biofilme total*		
	$\delta$	$r_A$	$\Phi$	$\delta$	$r_A$	$\Phi$	$\delta$	$r_A$	$\Phi$
0,5 a 1	-	-	-	0,00020	2,353	0,461	0,00020	2,353	0,461
1 a 2	0,0002	2,029	0,373	0,00025	2,353	0,502	0,00045	2,209	0,876
2 a 3	0,0004	2,228	0,408	0,00025	2,353	0,524	0,00070	2,259	1,234
3 a 4	0,0007	2,358	0,418	0,00030	2,353	0,626	0,00100	2,356	1,880
4 a 5	0,0010	2,380	0,475	0,00030	2,353	0,709	0,00130	2,373	2,847
5 a 6	0,0013	0,403	0,481	0,00100	2,353	2,379	0,00230	2,380	5,263

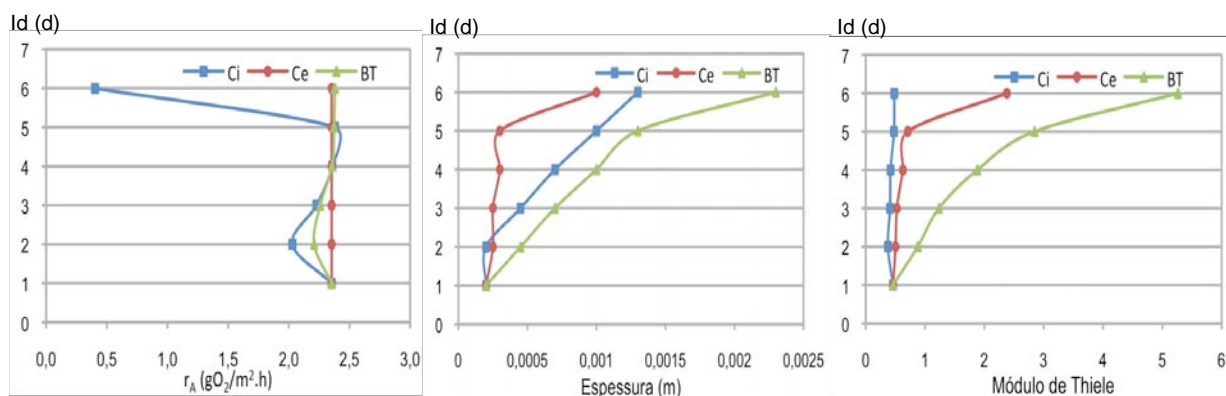
$\delta$  - Espessura (m);  $r_A$  – Fluxo mássico por unidade de área ( $\text{gO}_2/\text{m}^2.\text{h}$ );  $\Phi$  - Módulo de Thiele; (\*) – valores observados

Quadro 28 – Análise do comportamento do biofilme,  $S_0 = 1000 \text{ mg O}_2/\text{l}$

Id (dia)	Camada								
	interna			externa			biofilme total*		
	$\delta$	$r_A$	$\Phi$	$\delta$	$r_A$	$\Phi$	$\delta$	$r_A$	$\Phi$
0,5 a 1	-	-	-	0,0002	4,669	0,472	0,0002	4,669	0,472
1 a 2	0,0002	4,439	0,437	0,0003	4,669	0,673	0,00050	4,577	1,110
2 a 3	0,0005	4,512	0,442	0,0004	4,669	0,899	0,00090	4,582	2,004
3 a 4	0,0009	4,293	0,424	0,0002	4,669	0,442	0,00110	4,361	2,349
4 a 5	0,0011	4,429	0,431	0,0011	4,669	2,431	0,00220	4,549	4,800
5 a 6	0,0022	4,451	0,428	0,0018	4,669	3,945	0,00400	4,549	8,654

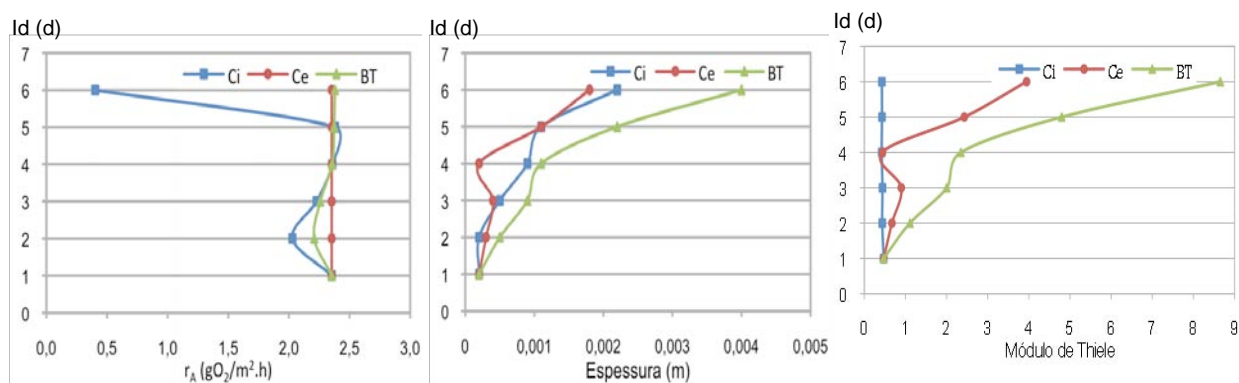
$\delta$  - Espessura (m);  $r_A$  – Fluxo mássico por unidade de área ( $\text{gO}_2/\text{m}^2.\text{h}$ );  $\Phi$  - Módulo de Thiele; (\*) – valores observados

Com base nos valores apresentados nos Quadros 27 e 28, elaboraram-se as Figuras 139 e 140, relativas às variações de espessuras, fluxo mássico e Módulo de Thiele das duas camadas de biofilme admitidas e do biofilme total, para as duas concentrações estudadas.



Ci – camada interna; Ce – camada externa; BT – biofilme total

Figura 139 – Análise do comportamento do biofilme,  $S_0 = 500 \text{ mgO}_2/\text{l}$



Ci – camada interna; Ce – camada externa; BT – biofilme total

Figura 140 – Análise do comportamento do biofilme,  $S_0 = 1000 \text{ mgO}_2/\text{l}$

Através das Figuras 139 e 140, constata-se que a aproximação adoptada para interpretar o comportamento do biofilme parece plausível, permitindo explicar os valores mais elevados de fluxo mássicos verificados para a idade de biofilme mais baixa que foi testada, entre 0,5 e 1 dia, e para as idades entre 4 e 5 dias e 5 e 6 dias.

De facto, para qualquer das concentrações de substrato estudadas, verifica-se que a variação de fluxo mássico do biofilme total para aquelas idades é idêntico ao verificado na camada exterior, em que o valor do fluxo mássico é o mais elevado, embora com uma concentração de substrato mais elevada esse efeito seja menos notório.

Por outro lado, observa-se que é na camada externa, e para as idades de biofilme mais altas, que se verifica um aumento brusco do Módulo de Thiele, o que deverá corresponder ao aumento de espessura daquela camada.

Com estas observações, parece poder admitir-se que a partir de 4 – 5 dias de idade do biofilme o seu crescimento não introduz qualquer vantagem para o processo, reforçando portanto o interesse do controlo da idade, ou da espessura do biofilme.

Como oportunamente se mostrou, as observações efectuadas com microscopia electrónica da estrutura do biofilme para as várias idades estudadas, de algum modo sustentam também as hipóteses anteriormente assumidas. Com efeito, apesar do seu carácter preliminar, foi possível verificar pela estrutura do biofilme quando a idade é menor, que, aparentemente, estão presentes poucas espécies e que existe ainda superfície de suporte que não foi colonizada, pelo que, não é expectável a presença de fenómenos de competição e, ou predação e, conseqüentemente de, processos inibitórios, o que deverá propiciar uma multiplicação celular e correspondente remoção de substrato mais rápidas.

Por outro lado, é notório que à medida que a idade do biofilme aumenta, a estrutura do biofilme se altera e que passam a existir diferentes formas de colónias, indicando a presença no biofilme de maior número de espécies. Assim, embora por razões biológicas distintas, parece de aceitar que as condições prevalentes para extremos da gama de idades de biofilme estudadas podem conduzir a remoções de substrato mais elevadas.

A abordagem utilizada neste trabalho e o dispositivo concebido para permitir o uso de sistemas de biomassa fixa a diferentes idades de biofilme poderá vir a proporcionar aplicações interessantes no domínio da despoluição de meios líquidos.

Concretamente, a aplicação do sistema ao tratamento de águas residuais favoreceria significativamente a etapa final de separação sólido / líquido. Com efeito, se se admitir um sistema que fosse explorado, por exemplo, a uma idade de biofilme de 2 dias, por um lado para beneficiar de melhores taxas de remoção, relativas a filmes mais jovens, e, por outro, para utilizar um biofilme com uma estrutura mais consolidada, os benefícios parecem evidentes: (i) àquela idade de biofilme é de admitir que os desprendimentos de biomassa do suporte sejam bastante reduzidos, minimizando portanto os sólidos em suspensão na fase líquida que, posteriormente, é submetida a sedimentação e (ii) para controlar a idade do biofilme, no tempo correspondente, o suporte com biomassa seria isolado da fase líquida, entrando em funcionamento outro reactor e, conseqüentemente, o biofilme poderia ser objecto de raspagem a seco, evitando matéria em suspensão na fase líquida para posterior separação.

Ou seja, no processo convencional a biomassa resultante da conversão de substrato acaba, forçosamente, na fase líquida, aquando da separação do suporte. No sistema proposto, a biomassa seria removida controladamente e a seco.



## 7. Conclusões e Perspectivas de Trabalho Futuro

O presente trabalho disponibilizou uma nova abordagem para o estudo de biofilmes, introduzindo um novo conceito, idade do biofilme, para cuja materialização propôs um novo dispositivo para operação de sistemas de biomassa fixa com filmes de espessura controlada.

Nesta perspectiva, o trabalho permitiu estudar biofilmes numa gama de idades entre 0,5 – 1 dia e 5 – 6 dias, possibilitando a comparação de comportamentos de reactores operados a espessura de filme constante, contrariamente ao que é normalmente realizado em sistemas de biomassa fixa contínuos.

Os resultados permitiram concluir que a idade do biofilme pode influenciar significativamente a remoção de substrato, tendo-se constatado que as idades de 0,5 – 1 dia, 4 – 5 dias e 5 – 6 dias foram as que apresentam resultados mais favoráveis.

Através da metodologia proposta para interpretação do comportamento do biofilme, decompondo-o em duas camadas, concluiu-se que a camada externa parece controlar a transferência de massa, tendo permitido explicar as variações dos fluxos mássicos registados, as quais parecem encontrar alguma base nas observações efectuadas com microscopia electrónica, apesar do seu carácter preliminar.

O trabalho permitiu ainda concluir ser possível avaliar a espessura do biofilme através da variação da capacidade eléctrica de um meio previamente caracterizado, o que foi materializado por um dispositivo de medição não invasivo da espessura do biofilme.

Com os resultados obtidos, conclui-se que poderá ser vantajosa a operação de sistemas de biomassa fixa com idade controlada. Para além de potenciais benefícios de eficiência, principalmente correspondentes a filmes jovens, tais sistemas permitiriam também reduzir significativamente a matéria em suspensão na etapa de sedimentação final. Com efeito, se o controlo da idade do biofilme for efectuado a seco, isto é, por raspagem de biomassa quando o reactor for retirado de serviço, evitar-se-ia a passagem à fase líquida de biofilme que naturalmente se desprende do suporte.

Dado o carácter inovador do trabalho, diversas perspectivas de continuidade se colocam, podendo centrar-se em vários domínios.

Assim, desde logo, considera-se que seria interessante prosseguir o estudo para uma faixa mais alargada de idades de biofilme e para outras concentrações de substrato. Tal deveria permitir consolidar tendências observadas e eventualmente contribuir para a modelação da cinética do sistema estudado.

Adicionalmente, admite-se que o sistema possa ter um potencial razoável para a biodegradação de xenobióticos, dada a possibilidade de efectuar adaptações na fase de crescimento de biofilme até à idade pretendida.

Importaria também comparar a produção de lamas por exploração do sistema a diferentes idades de biofilme e verificar a potencial redução de matéria em suspensão na etapa de sedimentação final.

Relativamente ao método de medição “on-line” não destrutivo da biomassa desenvolvido dever-se-ia, em futuros estudos, investigar melhor o efeito de blindagem, verificado ampliando o número de experiências para assegurar a representatividade do método.

O trabalho futuro deveria também incidir na caracterização de espécies de microrganismos presentes em biofilmes de diferentes idades, bem como fenómenos de interacção entre espécies. Seria igualmente interessante obter informação sobre a estrutura do biofilme, para diferentes idades, nomeadamente a 3D, por forma a aprofundar mecanismos de transferência de massa e, eventualmente, detectar outras características dos biofilmes.

## 8. Referências

- Amann, R. I., Ludwig, W. and Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*. Vol. 59, pp 143 - 169.
- Ardern, E., Lockett, W. T. (1915). Oxidation of Sewage Without the Aid of Filters. *Journal of the Society of Chemical Industry*. Vol. 34, pp 937 - 943.
- Atkinson, B., Davies, I. J. (1974). The overall rate of substrate uptake (reaction) by microbial films. Part I – A biological rate equation. *Chemical Engineering Research and Design*. Vol. 52 (a), pp 248 – 259.
- Bader F. G., (2004). Analysis of double-substrate limited growth. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 20 (2), pp 183 – 202.
- Benefield, L., Molz, F., (1985). Mathematical simulation of a biofilm process. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 27, (7), pp 921 - 931.
- Boaventura R. A., Rodrigues A. E. (1988). Consecutive reactions in fluidized-bed biological reactors: modeling and experimental study of wastewater denitrification. *Chemical Engineering Science*. Vol. 43, (10), pp 2715 – 2728.
- Braha, A., Hafner, F. (1987). Use of lab batch reactors to model biokinetics. *Water Research*. Vol. 21 (1), pp 73 - 81.
- Brown, J. A., (2005). The Early History of Wastewater Treatment and Disinfection. *American Society of Civil Engineers*. Vol. 173, Nº. 40792
- Bungay, H. R., Whalen, W. J., and Sanders, W. M. (1969). Microprobe techniques for determining diffusivities and respiration rates in microbial slime systems. *Biotechnology Bioengineering*. Vol. 11, pp 765 – 772.
- Burks, B., Minnis M. (1994). *On-Site Wastewater Treatment Systems*. Madison, Conn.: Hogarth House Ltd.,
- Button, D. K. (1985). Kinetics of Nutrient-Limited Transport and Microbial Growth. *Microbiological Reviews*. Vol. 49 (3), pp 270 - 297.
- Center for biofilm engineering – 2008 - in [http://www.erc.montana.edu/Res-Lib99-SW/Image\\_Library/Structure-Function/default.htm](http://www.erc.montana.edu/Res-Lib99-SW/Image_Library/Structure-Function/default.htm)

Chang, H. T., Rittmann, B. E. (1987) (a), Mathematical Model of Biofilm on Activated Carbon. Environmental Science and Technology. Vol. 21 (3), pp. 273 - 280.

Chang, H. T., Rittmann, B. E. (1987) (b), Verification of the Model of Biofilm on Activated Carbon. Environmental Science and Technology. Vol. 21 (3), pp. 280 - 288.

Chang, I., Gilbert, E. S., Eliashberg, N. and Keasling, J. D. (2003) A three dimensional, stochastic simulation of biofilm growth and transport-related factors that affect structure. Microbiology. Vol. 149, pp 2859 –2871.

Characklis, W. G., Marshall, K. C. (1989). Biofilms. John Wiley, New York.

Chaudhry M. A. S., Beg, S. A., (1998). Review on the Mathematical Modeling of Biofilm Processes: Advances in Fundamentals of Biofilm Modeling. Chemical Engineering and Technology. Vol. 21 – 9, pp 701 – 710.

Chen, Y. S., Bungay, H. R. (1981). Micro-electrode studies of oxygen transfer in trickling filter slimes. Biotechnology Bioengineering. Vol. 23, pp 781 - 792.

Chudoba, J. (1989). Discussion of: Effect of Culture History on the Determination of Biodegradation Kinetics by Batch and Fed-Batch Techniques. Journal of the Water Pollution Control Federation. Vol. 61 (3), pp. 367 - 369.

Commission on Life Sciences. (1977). Drinking Water and Health. Vol 1, pp 940

Cooper, P. F. (2000). Historical aspects of wastewater treatment. IWA Publishing. Decentralized Sanitation and Reuse: Concepts, Systems and Implementation. Edited by P. Lens, G. Zeeman and G. Lettinga. ISBN: 1 900222477, pp 11 – 38.

Costerton, J. W., Irvin, R. T., Cheng, K. J. (1981). Role of bacterial surface structures in pathogenesis. Critical Reviews in Microbiology. Vol. 8 (4), pp 303 - 338.

Costerton, J. W. (1985). The role of bacterial exopolysaccharides in nature and disease. Developments in Industrial Microbiology. Vol. 26, pp 249-261.

Costerton, J. W., Lewandowski, Z., de Beer, D., Caldwell, D., Korben, D., James, G., (1994). Minireview: Biofilms, the Customized Micronich. Journal Bacteriology. Vol.176 (8), pp 2137 – 3142.

Counotte, G. H. M., Prins, R. A. (1979). Calculation of  $K_m$  and  $V_{max}$  from substrate concentration versus time plot. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 38 (4), pp 758 - 760.



Daigger, G. T., Grady Jr. C. P. L. (1982) (a). An Assessment of the role of physiological adaptation in the transient response of bacterial cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 24 (6), pp 1427 – 1444.

Daigger, G. T., Grady Jr. C. P. L. (1982) (b). Review Paper – The Dynamics of Microbial Growth on Soluble Substrates. A Unifying Theory. *Water Research*. Vol. 16 (4), pp 365 - 382.

de Beer, D., van den Heuvel, J. C., Ottengraf, S.P. (1993). Microelectrode measurements of the activity distribution in nitrifying bacterial aggregates. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 59 (2), pp 573 - 579.

de Beer, D., Stoodley, P., Roe, F. and Lewandowski, Z. (1994). Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnology Bioengineering*. Vol. 43 (11), pp 1131 - 1138.

de Beer, D., Stoodley, P., (2006). Microbial Biofilms. *Prokaryotes*. Chapter 3.10. pp 904 – 937.

Deront M., Samb F. M., Adler N., Péringer P. (1998). Biomass growth monitoring using pressure drop in a concurrent biofilter. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol 60 (1), pp 97 – 104.

Dibdin W. J. (1907). The Disposition and Analysis of sewage Debris in Contact Beds. *The Analyst*. Vol. 32, pp 108 – 116.

Domingos, I. (1999). Contribuição para o estudo da biodegradação aeróbia de ácido abiético e terpineol (Tese de Doutorado). FCT – UNL.

Duggleby, R. G. Morrison, J. F. (1977). The analysis of progress curves for enzyme-catalysed reactions by non-linear regression. *Biochimica Biophysica Acta*. April 12 Vol. 481 (2), pp 297 - 312.

Dutta, S., (2007). Mathematical Modeling of the Performance of a Rotating Biological Contactor for Process Optimisation in Wastewater Treatment. Phd Thesis. Universität Fridericiana zu Karlsruhe.

Ellis, T. G., Smets, B. F., Magbanua, Jr. B. S., Grady Jr. C. P. L. (1996). Changes in measured biodegradation kinetics during the long-term operation of completely mixed activated sludge (CMAS) bioreactors. *Water Science & Technology*. Vol. 34 (5 – 6), pp 35 – 42.

Flemming, H. C., Szewzyk, U. and Gripe, T. (2000). Biofilms. Investigative Methods & Applications. In: Technomic Publishing Company, Inc. Pennsylvania. USA – pp 221- 224.

Flora, J. R. V., Suidan, M. T., Biswas, P., Sayles, G. D. (1993). Modeling substrate transport into biofilms: role of multiple ions and pH effects. Journal Environmental Engineering. Vol. 119, pp. 908 - 930.

Flora, J. R. V., Suidan, M. T., Biswas, P., Sayles, G. D. (1995) (a). Modelling algal Biofilms: role of carbon, light, cell surface, and ionic species. Water Environment Research. Vol. 67 (1), pp 87 - 94.

Flora, J. R. V., Suidan, M. T., Biswas, P., Sayles, G. D. (1995) (b). A modeling study of anaerobic biofilm systems: I. Detailed biofilm modeling. Biotechnology Bioengineering. Vol. 46 (1), pp. 43 - 53.

Flora, J. R. V., Suidan, M. T., Biswas, P., Sayles, G. D. (1995) (c). A modeling study of anaerobic biofilm systems: II. Reactor modeling. Biotechnology Bioengineering. Vol. 46 (1), pp 54 - 61.

Folwell, A. P. (1916). Sewerage – The Designing, Construction, and Maintenance of Sewerage Systems. John Wiley and Sons, Inc. New York, 7<sup>th</sup> edition, pp 1 - 12.

Fraden, J. (1995). AIP Handbook of Modern Sensors (Physics, Designs and Applications), 3rd ed., AIP Press, New York.

Furumai, H., Rittmann, B. E. (1994). Evaluation of Multiple - Species Biofilm and Floc Processes using a Simplified Aggregate Model. Water Science Technology. Vol. 29 (10-11), pp. 439 - 446.

Gadani V., Villon, P., Manem, J. A., Rittmann, B. E., (1993). A new method to solve non-steady-state multispecies biofilm model. Bulletin of Mathematical Biology. Vol. 55 (6), pp 1039 - 1061.

Gates, W. E., Marlar, J. T. (1968). Graphical analysis of batch culture using the Monod expressions. Journal of the Water Pollution Control Federation. November. Vol. 40 (11), pp 469 - 476.

Gjaltema, A. and Griebel, T. (1995). Laboratory biofilm reactors and on-line monitoring: Report of the discussion session. Water Science Technology. Vol. 32 (8), pp 257 – 261.

Gibbs, J. T. and Bishop, P. L. (1995). A method for describing biofilm surface roughness using geostatistical techniques, Water Science Technology. Vol. 32 (8), pp 91 – 98.

Grady Jr., C. P. L. , Smets, B. F., Barbeau, D. S. (1996). Variability in Kinetic Parameter Estimates: A Review of possible causes and proposed Terminology. Water Research. Vol. 30 (3), pp 742 - 748.

Harremoes, P. (1978). Biofilm kinetics. In Mitchell, R. (ed.). Water pollution microbiology Vol. 2, pp 71 - 109. John Wiley & Sons, New York, U.S.A.

Henrici A. T., (1933). Studies of freshwater bacteria. A direct microscopic method. Journal of Bacteriology. Vol 25, pp 277 – 286.

Hermanowicz, S. W. (2001). A simple 2D biofilm model yields a variety of morphological features. Mathematical Biosciences. Vol. 169, pp 1 – 14.

Hinson R. K., Kocher W. M. (1996). Model for effective diffusivities in aerobic biofilms. Journal Environmental Engineering. Vol. 122, pp 1023 – 1030.

Hirsch P., Pankratz S. H. (1970). Study of bacterial populations in natural environments by use of submerged electron microscope grids. Zeitschrift Allgemeine Mikrobiologie. Vol. 10 (8), pp 589 – 605.

Huston, M. A., DeAngelis, D. L., Post, W. (1998). New computer models unify ecological theory. BioScience. Vol. 38, pp 682 - 691.

Imai, T., Kusuda, T., Furumai, H. (1994). Kinetic Study and Mathematical Modeling of biofilm in an Anaerobic Fluidized Bed. Water Science Technology. Vol. 29 (10 – 11), pp 369 - 376.

Inoué, S. (1995). Foundations of confocal scanned imaging in light microscopy. In: J.B. Pawley (ed): Handbook of biological confocal microscopy. Plenum Press, New York.

Johnston, J. H. (1913). Eighth Report of Royal Commission on Sewage Disposal. The Analyst. Vol. 38, pp 535 - 541.

Johnston, J. H. (1915). Ninth and Final Report of Royal Commission on Sewage Disposal. The Analyst. Vol. 40, pp 421 - 424.

Jorgensen, B. B., Revsbech, N. P. (1983). Colorless sulfur bacteria, *Beggiatoa spp.* and *Thiovulum spp.*, in O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>S microgradients. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 45 (4), pp 1261 - 1270.

Keevil, C. W., Walker, J. T. (1992). Normarski DIC microscopy and image analysis of biofilms. Binary. Vol. 4, pp 93 - 95.

Kiersted, W. (1894). Sewage Disposal. John Wiley and Sons, New York, NY.

Kissel, J. C., McCarty, P. L., Street, R. L. (1984). Numerical Simulation of Mixed culture Biofilm. *Journal Environmental Engineering*. Vol. 110 (2), pp 393 - 411.

Kreft, J. U., Picioreanu, C., Wimpenny, J. W. T., van Loosdrecht, M. C. M. (2001). Individual-based modelling of biofilms *Microbiology*. Vol. 147, pp 2897 – 2912.

Kreft, J. U., and Wimpenny J. W. T. (2001) (a). Effect of EPS on biofilm structure and function as revealed by an individual-based model of biofilm growth. *Water Science Technology*. Vol. 43 (6), pp 135 – 141.

Kreft, J. U., and Wimpenny J. W. T. (2001) (b). Modelling biofilms with extracellular polymeric substances, In P. Gilbert, D. Allison, M. Brading, J. Verran, and J. Walker (ed.), *Biofilm community interactions: chance or necessity?* BioLine, Cardiff, Wales. pp 191–199.

Kuhl, M. and Jorgensen, B. B. (1992). Microsensor measurements of sulfate reduction and sulfide oxidation in compact microbial communities of aerobic biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 58 (4), pp 1164 - 1174.

LaMotta, E. J. (1976). Internal diffusion and reaction in biological films. *Journal Environmental Science & Technology*. Vol. 10 (8), pp 765 – 769.

Larsen, T. A., Harremoes, P. (1994). Degradation mechanisms of colloidal organic matter in biofilm reactors. *Water Research*. Vol. 28 (6), pp 1443 - 1452.

Laspidou, C. S., Rittmann, B. E. (2004). Modeling the development of biofilm density including active bacteria, inert biomass, and extracellular polymeric substances. *Water Research*. Vol. 38, pp 3349 – 3361.

Lawrence, J. R., Korber, D. R., Hoyle, B. D., Costerton J. W., Caldwell, D. E. (1991). Optical sectioning of microbial biofilms. *Journal of Bacteriology*. Vol. 173 (20), pp 6558 - 6567.

Lewandowski G. A. (1990). Batch biodegradation of industrial organic compounds using mixed liquor from different POTWs. *Research Journal of the Water Pollution Control Federation*. Vol. 62 (6), pp 803 - 827.

Lowcock, S. R. (1894). Experiments on the Filtration of Sewage. *Journal Minutes of The Proceedings*. Vol. 115 (1894), pp 297 - 314.

Maurício, R. Dias, C. J., Santana, F. (2006) Monitoring Biofilm Thickness using a Non-Destructive, on-line, Electrical Capacitance Technique. *Environmental Monitoring and Assessment*. Vol. 119, pp 599 – 607.

McGee, R. D., Drake, J. F., Fredrickson, A. G., Tsuchiya, H. M., (1972). Studies in intermicrobial symbiosis, *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus casei*. Canadian Journal of Microbiology. Vol. 18 (11), pp 1733 - 1742.

Melosi, M. V. (2000). The Sanitary City: Urban infrastructures in America from colonial times to the present, Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland, 578 pp.

Minski, M. (1988). Memoir on inventing the confocal scanning microscope. Scanning. Vol. 10, pp 128 – 138.

Motlagh, A. R., Voller, V.R., Semmens, M. J. (2006). Advective flow through membrane-aerated biofilms modeling results. Journal of Membrane Science. Vol. 273, pp 143 - 151.

Nielsen, L. P., Christensen, P. B., Revsbech, N. P., Sorensen, J. (1990). Denitrification and oxygen respiration in biofilms studied with a microsensor for nitrous oxide and oxygen. Microbiology and Ecology. Vol. 19 (1), pp 63 - 72.

Nogueira, R. Elenter, D., Brito, A., Melo L. F. Wagner, M., Morgenroth, E. (2005). Evaluating heterotrophic growth in a nitrifying biofilm reactor fluorescence *in situ* hybridization and mathematical modeling. Water Science and Technology. Vol. 52 (7), pp 135 – 141.

Noguera, D. R., Okabe, S., Picioreanu, C. (1999) (a). Biofilm modeling: present status and future directions. Water Science Technology. Vol. 39 (7), pp 273 - 278.

Noguera, D. R., Pizarro, G. Stahl, D. A. and Rittmann, B. E. (1999) (b). Simulation of multispecies biofilm development in three dimensions. . Water Science Technology. Vol. 39 (7), pp 123 – 130.

Noguera, D. R., Morgenroth, E. (2004). Introduction to the IWA Task Group on Biofilm Modeling. Water Science and Tecnology. Vol. 49 (11-12), pp 131 - 136.

Nyvad, B., Fejerskov, O. (1997) Assessing the stage of caries lesion activity on the basis of clinical and microbiological examination. Community Dentistry and Oral Epidemiology. Vol. 25 (1), pp 69 - 75.

Okpokwasili G. C., Nweke C. O. (2005). Microbial growth and substrate utilization kinetics. African Journal of Biotechnology, Vol. 5 (4), pp 305 – 317.

Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, S. J., Pace, N. R., Stahl, D. A. (1986). The microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. Annual Review of Microbiology. Vol. 40, pp 337 - 365.

Peters, R. W., Alleman, J. E. (1985). The History of Fixed Film Wastewater Treatment

Systems. Proceedings of the 1st International Conference on Fixed-Film Systems, Kings Island, Ohio. pp 60 – 88.

Picioreanu, C., van Loosdrecht, M. C. M., Heijnen, J. J. (1998) (a). Mathematical modeling of biofilms structure with hybrid differential discrete cellular automaton approach. *Biotechnology Bioengineering*. Vol. 58 (1), pp 101 - 116.

Picioreanu, C., van Loosdrecht, M. C., Heijnen, J. J. (1998) (b). A new combined differential-discrete cellular automaton approach for biofilm modeling: application for growth in gel beads. *Biotechnology Bioengineering*. Vol. 57 (6), pp 718 – 731.

Picioreanu, C., van Loosdrecht, M. C., Heijnen, J. J. (1999). Discrete-differential modeling of biofilm structure. *Water Science Technology*. Vol. 39 (7), pp 115 – 122.

Picioreanu, C., Kreft, J. U., van Loosdrecht, M. C. M. (2004). Particle-Based Multidimensional Multispecies Biofilm Model. *Applied Environmental Microbiology*. Vol. 70 (5), pp 3024 – 3040.

Pizarro, G. E., Garcia, C., Moreno, R., Sepulveda, M. E. (2004). Two-dimensional cellular automaton model for mixed-culture biofilm. *Water Science and Technology*. Vol. 49 (11-12) pp 193 - 198.

Richards, S. R. and Turner R. J. (1984). A comparative study of techniques for the examination of biofilms by scanning microscopy. *Water Research*. Vol. 18, pp 767 – 773

Rittmann, B. E., McCarty, P. L. (1980). Model of steady-state-biofilm kinetics. *Biotechnology Bioengineering*. Vol. 22 (11), pp 2343 - 2357.

Rittmann, B. E., McCarty, P. L. (1980). Evaluation of steady-state-biofilm kinetics. *Biotechnology Bioengineering*. Vol. 22 (11), pp 2359 – 2373.

Rittmann, B. E., McCarty, P. L. (1981). Substrate Flux into Biofilms of any Thickness. *Journal Environmental Engineering*. Vol. 107 (EE3), pp 831 - 850.

Rittmann, B. E. (1982). The effect of shear stress on biofilm loss rate. *Biotechnology Bioengineering*. Vol. 24 (2), pp 501 - 506.

Rittmann, B. E., Dovantzis, K. (1983). Dual limitation of biofilm kinetics. *Water Research*. Vol. 17 (12), pp 1727 - 1734.

Rittmann, B. E., Brunner, C. W. (1984). A nonsteady-state biofilm process for advanced organics removal. *Journal Water Pollution Control Federation*. Vol. 56 (7), pp 874 – 880.

Rittmann, B. E., Manem, J. A. (1992). Development and experimental evaluation of a steady-state, multispecies biofilm model. *Biotechnology Bioengineering*. Vol. 39 (9), pp 914 - 922.

Rittmann, B. E., Schwarz, A. O., Eberl, H. J. Morgenroth E., Perez J., van Loosdrecht, M., Wanner, O., (2004). Results from the multi-species Benchmark Problem (BM3) using one-dimensional models. *Water Science and Technology*. Vol. 49 (11-12), pp 163 - 168.

Robinson, J. A., James, M., Tiedje, J. M. (1983). Nonlinear estimation of Monod growth kinetic parameters from a single substrate depletion curve. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 45 (5), pp 1453 – 1458.

Royal Commission on Sewage Disposal. (1908). The Fifth Report – Methods of Treating and Disposing of Sewage. *The British Medical Journal*. Nov. 7, pp 1447.

Santana, F. (1986). Contribuição para o Estudo da Modelização de Reactores de Biomassa Fixa (Discos Biológicos). Tese de Doutoramento. FCT – UNL.

Seeger, H., (1999). The History of German Waste Water Treatment. *European Water Management*. Vol. 2 (5), pp 51 - 56.

Seker S., Beyenal H., Tanyolac A. (1995). The effects of biofilm thickness on biofilm density and substrate consumption rate in a differential fluidized bed biofilm reactor (DFBBR). *Journal of Biotechnology*. Vol. 41, pp 39 – 47.

Simkins, S. Alexander, M. (1984). Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 47 (6), pp 1299-1306.

Simkins, S. Alexander, M. (1985). "Nonlinear estimation of the parameters of Monod kinetics that best describe mineralization of several substrate concentration by dissimilar bacterial densities". *Applied and Environmental Microbiology*. pp 816 - 824.

Skowlund, C. T. (1990). Effect of biofilm growth on steady-state biofilm models. *Biotechnology Bioengineering*. Vol. 35 (5), pp 502 - 510.

Smith, E. D., Bandy J. T., (1980). "A History of the Rotating Contactor Process," *Proceedings of the First National Symposium/Workshop on Rotating Biological Contactor Technology*, Vol. 1, pp. 11 – 23

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (2005). American Public Health Association (APHA). 21<sup>st</sup> Edition.

Stewart, P. S. (1993). A model of biofilm detachment. *Biotechnology Bioengineering*. Vol. 41 (1), pp 111 - 117.

Stewart, P. S., (2003). Diffusion in Biofilms – Guest Commentaries. *Journal of Bacteriology*. Vol. 185 (5), pp 1485 - 1491.

Stoddart, F. W. (1893). Water Analysis – The Interpretation of Results. *The Analyst*. Vol. 18, pp 293 - 306.

Szwerinski, H., Arvin, E., Harremoes, P. (1986). pH-decrease in nitrifying biofilms. *Water Research*. Vol. 20 (8), pp 971 - 976.

Tanaka, H., Dunn, I. J., (1982). Kinetics of biofilm nitrification. *Biotechnology Bioengineering*. Vol. 24 (3), pp 669 - 689.

Templeton, L. L., Grady Jr. C. P. L. (1988). Effect of Culture History on the Determination of Biodegradation Kinetics by Batch and Fed-Batch Techniques. *Journal of the Water Pollution Control Federation*. Vol. 60 (5), pp 651 - 658.

van Loosdrecht, M. C. M., Eikelboom, D., Gjaltema, A., Mulder, A., Tjihuis, L., Heijnen, J. J. (1995). Biofilm structures. *Water Science Technology*. Vol. 32, pp 35 - 43.

Veluchamy R. R. A. (2006). Structure and Activity of *Pseudomonas Aeruginosa* PAO1 Biofilms. Thesis for Master of science in Environmental Engineering. Montana State University.

Wanner, J. (1994). Activated sludge population dynamics. *Water Science & Technology*. Vol. 30 (11), pp 159 - 169.

Wanner, O., Gujer, W. (1984). Competition in Biofilms. *Water Science Technology*. Vol. 17 (2 – 3), pp 27 - 44.

Wanner, O., Gujer, W. (1986). A multi-species biofilm model. *Biotechnology Bioengineering*. Vol. 28, pp 314 - 328.

Wanner, O. (1995). New experimental findings and biofilm modeling concepts. *Water Science Technology*. Vol. 32 (8), pp 133 - 140.

Wanner, O., Reichert, P. (1996). Mathematical modeling of mixed-culture biofilms. *Biotechnology Bioengineering*. Vol. 49 (2), pp 172 - 184.

Wanner, O., Morgenroth, E. (2004). Biofilm modeling with AQUASIM. *Water Science and Technology*. Vol. 49 (11-12), pp 137 - 144.



Wasche S., Horn H., Hempel D.C. (2002). Influence of growth conditions on biofilm development and mass transfer at the bulk / biofilm interface. *Water Research*. Vol. 36, pp 4775 – 4784.

Williamson, K., McCarty , P. L. (1976). A model of substrate utilization by bacterial. *Journal Water Pollution Control Federation*. Vol. 48 (1), pp 9 – 24.

Wimpenny, J. W., Coombs, J. P. (1983). Penetration of oxygen into bacterial colonies. *Journal General Microbiology*. Vol. 129, pp 1239 - 1242.

Wimpenny J., W. Manz W., Szewzyk, U., (2000), Heterogeneity in Biofilms. *FEMS Microbiology Reviews*. Vol. 24 – 5, pp 661 - 671.

Woese, C., Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. Vol. 74 (11), pp 5088 - 5090.

Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiology Reviews*. Vol. 51 (2), pp 221 - 271.

Wolf, W., Picioreanu, C., van Loosdrecht, M. C. M. (2007). Kinetic modeling of phototrophic biofilms – the Phobia model. *Biotechnology and Bioengineering* (DOI 10.1002/bit.21306) – Accepted Preprint

Yoon, H., Klinzing, G., Blanch, H. W. (1977). Competition for mixed substrates by microbial populations *Biotechnology Bioengineering*. Vol. 19, (8) pp. 1193 - 1210.

Xavier, J. B., White, D. C., Almeida, J. S. (2003). Automated biofilm morphology quantification from confocal laser scanning microscopy imaging. *Water Science and Technology*. Vol. 47 (5), pp 31 - 37.

Zhang, T. C., Fu,Y. C., Bishop, P. L. (1994). Competition in Biofilms. *Water Science Technology*. Vol. 29 (10 – 11), pp 263 - 270.

Zinn M., Witholt, B., Egli T., (2004). Dual nutrient limited growth: models, experimental observations, and applications. *Journal of Biotechnology*. Vol. 113, pp 263 – 279.



## **ANEXOS**



## **ANEXO 1**

Quadros 1 e 2 – procedimento (exemplo) para desenvolvimento de biofilmes com idade entre 0,5 e 1 dia, e entre 5 e 6 dias (casos extremos) de modo a analisar as taxas de degradação do substrato. Para os ensaios com idades intermédias, o procedimento foi idêntico havendo, no entanto, necessidade de alterar o número de reactores em funcionamento consoante a idade de biofilme pretendida.



Quadro 1 - Procedimento experimental para o Ensaio com idade de biofilme entre 0,5 e 1 dia.

Tempo de Ensaio	Reactor 1		Reactor 2		Reactor 3		Reactor 4		Reactor 5		Reactor 6	
	Operação	Controlo Analítico	Operação	Controlo Analítico	Operação	Controlo Analítico	Operação	Controlo Analítico	Operação	Controlo Analítico	Operação	Controlo Analítico
0 h - 12 h	✓	X	X	X								
12 h – 24 h	✓	✓	✓	X								
24 h – 36 h	✓	X	✓	✓								
36 h – 48 h	✓	✓	✓	X								
48 h – 60 h	✓	X	✓	✓								
60 h – 72 h	✓	✓	✓	X								
72 h – 84 h	✓	X	✓	✓								
84 h – 96 h	✓	✓	✓	X								
96 h – 108 h	✓	X	✓	✓								
108 h – 120 h	✓	✓	✓	X								
120 h – 132 h	✓	X	✓	✓								
132 h – 144 h	✓	✓	✓	X								
144 h – 156 h	✓	X	✓	✓								
156 h – 168 h	✓	✓	✓	X								
168 h – 180 h	✓	X	✓	✓								
180 h – 192 h	✓	✓	✓	X								
192 h – 204 h	✓	X	✓	✓								
204 h – 216 h	✓	✓	✓	X								
216 h – 228 h	✓	X	✓	✓								
228 h - 240 h	✓	✓	✓	X								

Operação – O reactor está em funcionamento para promover o crescimento da biomassa da espessura em análise, (determinada idade).

Controlo Analítico – o reactor está em funcionamento e em análise, isto é, durante este período são recolhidas amostras do efluente para determinação do CQO, TOC, SST e SSV.

Quadro 2 - Procedimento experimental para o Ensaio com idade de biofilme entre 5 e 6 dia.

Tempo de Ensaio	Reactor 1		Reactor 2		Reactor 3		Reactor 4		Reactor 5		Reactor 6	
	Operação	Controlo Analítico	Operação	Controlo Analítico	Operação	Controlo Analítico	Operação	Controlo Analítico	Operação	Controlo Analítico	Operação	Controlo Analítico
0 h - 12 h	✓	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
12 h – 24 h	✓	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
24 h – 36 h	✓	X	✓	X	X	X	X	X	X	X	X	X
36 h – 48 h	✓	X	✓	X	X	X	X	X	X	X	X	X
48 h – 60 h	✓	X	✓	X	✓	X	X	X	X	X	X	X
60 h – 72 h	✓	X	✓	X	✓	X	X	X	X	X	X	X
72 h – 84 h	✓	X	✓	X	✓	X	✓	X	X	X	X	X
84 h – 96 h	✓	X	✓	X	✓	X	✓	X	X	X	X	X
96 h – 108 h	✓	X	✓	X	✓	X	✓	X	✓	X	X	X
108 h – 120 h	✓	X	✓	X	✓	X	✓	X	✓	X	X	X
120 h – 132 h	✓	✓	✓	X	✓	X	✓	X	✓	X	✓	X
132 h – 144 h	✓	✓	✓	X	✓	X	✓	X	✓	X	✓	X
144 h – 156 h	✓	X	✓	✓	✓	X	✓	X	✓	X	✓	X
156 h – 168 h	✓	X	✓	✓	✓	X	✓	X	✓	X	✓	X
168 h – 180 h	✓	X	✓	X	✓	✓	✓	X	✓	X	✓	X
180 h – 192 h	✓	X	✓	X	✓	✓	✓	X	✓	X	✓	X
192 h – 204 h	✓	X	✓	X	✓	X	✓	✓	✓	X	✓	X
204 h – 216 h	✓	X	✓	X	✓	X	✓	✓	✓	X	✓	X
216 h – 228 h	✓	X	✓	X	✓	X	✓	X	✓	✓	✓	X
228 h - 240 h	✓	X	✓	X	✓	X	✓	X	✓	✓	✓	X

CONTÍNUAÇÃO DO PROCEDIMENTO ATÉ 10 DIAS DE CONTROLO ANALÍTICO EFECTIVO

Operação – O reactor está em funcionamento para promover o crescimento da biomassa da espessura em análise, (determinada idade).  
 Controlo Analítico – o reactor está em funcionameno e em análise, isto é, durante este período são recolhidas amostras do efluente para determinação do CQO, TOC, SST e SSV.



## **ANEXO 2**

Quadros 1 a 7 – Resultados obtidos durante a Fase 2 para as várias idades de biofilme analisadas e para o ensaio contínuo.

- Valores expressos em DOC e CQO (valores registados e valores médios diários).
- Fluxos mássicos por unidade de área e por unidade de volume de biofilme.

Quadro 1 – Fase experimental 2 – Id 0,5 a 1

Dia de Ensaio	Hora de Recolha	DOC (mgC/l)	DOC md (mgC/l)	CQO (mgO <sub>2</sub> /l)	CQO md (mgO <sub>2</sub> /l)	Q (S0-S1)/A (mgDOC/m <sup>2</sup> .h)	Q (S0-S1)/A (mgCQO/m <sup>2</sup> .h)	Q (S0-S1)/V (mgDOC/m <sup>3</sup> .h)	Q (S0-S1)/V (mgCQO/m <sup>3</sup> .h)
<b>1</b>	22:00	230	227	500	494	0,00	0,02	1,38	99,01
	4:00	230		500					
	10:00	229		500					
	16:00	225		482					
	22:00	221		487					
<b>2</b>	4:00	223	184	452	383	0,07	0,37	341,24	1855,89
	10:00	213		394					
	16:00	178		400					
	22:00	122		285					
<b>3</b>	4:00	105	105	220	198	0,65	1,39	3254,94	6944,61
	10:00	102		227					
	16:00	102		195					
	22:00	111		150					
<b>4</b>	4:00	106	101	150	152	0,68	1,97	3406,91	9868,90
	10:00	102		150					
	16:00	102		154					
	22:00	96		154					
<b>5</b>	4:00	95	91	152	146	0,74	1,96	3710,44	9792,91
	10:00	95		152					
	16:00	88		143					
	22:00	88		137					

Dia de Ensaio	Hora de Recolha	DOC (mgC/l)	DOC md (mgC/l)	CQO (mgO2/l)	CQO md (mgO2/l)	Q (S0-S1)/A (mgDOC/m <sup>2</sup> .h)	Q (S0-S1)/A (mgCQO/m <sup>2</sup> .h)	Q (S0-S1)/V (mgDOC/m <sup>3</sup> .h)	Q (S0-S1)/V (mgCQO/m <sup>3</sup> .h)
<b>6</b>	4:00	88	85	128	119	0,78	2,07	3916,57	10373,16
	10:00	88		127					
	16:00	88		106					
	22:00	74		116					
<b>7</b>	4:00	85	77	116	109	0,85	2,19	4257,39	10960,32
	10:00	77		106					
	16:00	75		106					
	22:00	72		110					
<b>8</b>	4:00	76	78	108	87	0,88	2,30	4388,09	11478,41
	10:00	70		74					
	16:00	85		81					
	22:00	82		83					
<b>9</b>	4:00	78	77	81	81	0,81	2,35	4072,82	11731,69
	10:00	82		82					
	16:00	76		81					
	22:00	70		82					
<b>10</b>	4:00	79	77	79	82	0,85	2,35	4264,72	11766,23
	10:00	81		82					
	16:00	78		82					
	22:00	70		85					

Quadro 2 – Fase experimental 2 – Id 1 a 2

Dia de Ensaio	Hora de Recolha	DOC (mgC/l)	DOC md (mgC/l)	CQO (mgO <sub>2</sub> /l)	CQO md (mgO <sub>2</sub> /l)	Q (S0-S1)/A (mgDOC/m <sup>2</sup> .h)	Q (S0-S1)/A (mgCQO/m <sup>2</sup> .h)	Q (S0-S1)/V (mgDOC/m <sup>3</sup> .h)	Q (S0-S1)/V (mgCQO/m <sup>3</sup> .h)
1	10:00	230	221	507	469	0,05	0,21	109,91	473,84
	22:00	212		430					
2	10:00	225	214	323	293	0,08	1,18	186,66	2633,14
	22:00	204		263					
3	10:00	200	195	278	261	0,19	1,36	429,82	3022,02
	22:00	189		245					
4	10:00	185	168	220	220	0,34	1,59	752,18	3526,54
	22:00	152		220					
5	10:00	151	135	177	179	0,52	1,81	1166,03	4028,51
	22:00	118		181					
6	10:00	116	116	181	177	0,63	1,83	1399,36	4055,63
	22:00	115		173					
7	10:00	114	104	115	127	0,69	2,10	1536,16	4676,30
	22:00	95		138					
8	10:00	97	97	148	116	0,73	2,16	1627,16	4802,69
	22:00	97		85					
9	10:00	100	98	71	114	0,73	2,17	1619,18	4829,81
	22:00	96		157					
10	10:00	104,1	104,6	102	108,0	0,69	2,21	1539,36	4910,14
	22:00	105,2		113					

Quadro 3 – Fase experimental 2 – Id 2 a 3

Dia de Ensaio	Hora de Recolha	DOC (mgC/l)	DOC md (mgC/l)	CQO (mgO <sub>2</sub> /l)	CQO md (mgO <sub>2</sub> /l)	Q (S0-S1)/A (mgDOC/m <sup>2</sup> .h)	Q (S0-S1)/A (mgCQO/m <sup>2</sup> .h)	Q (S0-S1)/V (mgDOC/m <sup>3</sup> .h)	Q (S0-S1)/V (mgCQO/m <sup>3</sup> .h)
1	10:00	230	220	507	446	0,06	0,34	92,10	570,27
	22:00	210		384					
2	10:00	195	198	324	302	0,18	1,14	291,97	1892,73
	22:00	201		280					
3	10:00	195	181	259	259	0,27	1,38	449,00	2291,84
	22:00	167		259					
4	10:00	168	168	170	170	0,34	1,86	565,52	3105,42
	22:00	168		170					
5	10:00	158	138	144	169	0,51	1,87	845,05	3120,78
	22:00	118		194					
6	10:00	120	114	164	170	0,64	1,86	1063,80	3105,42
	22:00	108		177					
7	10:00	124	108	162	162	0,67	1,91	1114,73	3182,18
	22:00	93		162					
8	10:00	105	93	154	116	0,75	2,16	1254,22	3604,32
	22:00	82		79					
9	10:00	84	101	82	97	0,71	2,27	1187,86	3780,85
	22:00	117		112					
10	10:00	109	104	74	99	0,69	2,26	1156,73	3765,50
	22:00	98,9		124					

Quadro 4 – Fase experimental 2 – Id 3 a 4

Dia de Ensaio	Hora de Recolha	DOC (mgC/l)	DOC md (mgC/l)	CQO (mgO <sub>2</sub> /l)	CQO md (mgO <sub>2</sub> /l)	Q (S0-S1)/A (mgDOC/m <sup>2</sup> .h)	Q (S0-S1)/A (mgCQO/m <sup>2</sup> .h)	Q (S0-S1)/V (mgDOC/m <sup>3</sup> .h)	Q (S0-S1)/V (mgCQO/m <sup>3</sup> .h)
1	10:00	230	203	507	401	0,15	0,59	161,18	655,73
	22:00	177		294					
2	10:00	188	170	248	276	0,33	1,28	366,88	1421,46
	22:00	152		304					
3	10:00	171	161	249	240	0,38	1,48	423,37	1641,49
	22:00	150		231					
4	10:00	150	123	207	171	0,59	1,86	657,19	2064,40
	22:00	96		135					
5	10:00	93	101	135	134	0,71	2,06	788,84	2290,31
	22:00	109		134					
6	10:00	103	99	127	124	0,72	2,12	801,18	2351,71
	22:00	95		122					
7	10:00	103	105	134	117	0,69	2,16	767,53	2397,00
	22:00	106		100					
8	10:00	95	94	103	109	0,75	2,20	829,98	2447,40
	22:00	94		115					
9	10:00	95	92	124	115	0,76	2,17	845,42	2411,58
	22:00	89		106					
10	10:00	94	97	105	81	0,73	2,36	813,46	2617,79
	22:00	101		57					

Quadro 5 – Fase experimental 2 – Id 4 a 5

Dia de Ensaio	Hora de Recolha	DOC (mgC/l)	DOC md (mgC/l)	CQO (mgO <sub>2</sub> /l)	CQO md (mgO <sub>2</sub> /l)	Q (S0-S1)/A (mgDOC/m <sup>2</sup> .h)	Q (S0-S1)/A (mgCQO/m <sup>2</sup> .h)	Q (S0-S1)/V (mgDOC/m <sup>3</sup> .h)	Q (S0-S1)/V (mgCQO/m <sup>3</sup> .h)
1	10:00	230	174	507	340	0,31	0,93	255,13	772,52
	22:00	119		172					
2	10:00	82	79	246	260	0,83	1,37	693,29	1137,67
	22:00	76		275					
3	10:00	90	81	136	106	0,82	2,22	683,34	1849,55
	22:00	73		75					
4	10:00	74	85	79	100	0,80	2,25	664,55	1874,50
	22:00	96		122					
5	10:00	74	86	126	102	0,80	2,24	663,77	1866,25
	22:00	97		79					
6	10:00	90	86	137	79	0,79	2,37	661,95	1974,28
	22:00	82		206					
7	10:00	97	84	67	72	0,80	2,41	669,98	2005,55
	22:00	72		77					
8	10:00	91	80	76	78	0,83	2,37	688,68	1977,54
	22:00	69		80					
9	10:00	91	82	90	78	0,82	2,38	679,47	1979,46
	22:00	73		66					
10	10:00	92	83	77	78	0,81	2,37	676,55	1978,12
	22:00	73		79					

Quadro 6 – Fase experimental 2 – Id 5 a 6

Dia de Ensaio	Hora de Recolha	DOC (mgC/l)	DOC md (mgC/l)	CQO (mgO <sub>2</sub> /l)	CQO md (mgO <sub>2</sub> /l)	Q (S0-S1)/A (mgDOC/m <sup>2</sup> .h)	Q (S0-S1)/A (mgCQO/m <sup>2</sup> .h)	Q (S0-S1)/V (mgDOC/m <sup>3</sup> .h)	Q (S0-S1)/V (mgCQO/m <sup>3</sup> .h)
1	10:00	230	145	507	405	0,39	0,57	179,20	258,10
	22:00	87		302					
2	10:00	84		177					
	22:00	73	79	179	178	0,83	1,82	378,95	828,09
3	10:00	85		189					
	22:00	71	78	186	187	0,84	1,77	380,84	804,44
4	10:00	83		190					
	22:00	80	82	120	155	0,82	1,95	371,78	885,45
5	10:00	95		124					
	22:00	62	79	123	124	0,83	2,12	378,90	964,26
6	10:00	73		122					
	22:00	82	78	77	100	0,84	2,25	381,62	1023,61
7	10:00	81		77					
	22:00	75	78	76	76	0,84	2,38	381,30	1083,26
8	10:00	85		77					
	22:00	72	78	77	77	0,84	2,38	380,22	1081,17
9	10:00	85		75					
	22:00	72	79	77	76	0,83	2,39	379,15	1084,31
10	10:00	76		76					
	22:00	81	78	77	77	0,84	2,38	379,84	1082,22



Quadro 7 – Fase experimental 2 – Ensaio Contínuo

Dia de Ensaio	Hora de Recolha	DOC (mgC/l)	DOC md (mgC/l)	CQO (mgO <sub>2</sub> /l)	CQO md (mgO <sub>2</sub> /l)	Q (S0-S1)/A (mgDOC/m <sup>2</sup> .h)	Q (S0-S1)/A (mgCQO/m <sup>2</sup> .h)	Q (S0-S1)/V (mgDOC/m <sup>3</sup> .h)	Q (S0-S1)/V (mgCQO/m <sup>3</sup> .h)
1	10:00	230	230	507	502	0,00	0,03	1,52	159,34
	22:00	229		496					
2	10:00	215	213	432	431	0,09	0,43	198,33	944,78
	22:00	212		429					
3	10:00	196	186	367	335	0,24	0,95	398,35	1584,95
	22:00	177		304					
4	10:00	175	174	259	249	0,31	1,43	342,01	1584,69
	22:00	173		239					
5	10:00	170	169	204	193	0,33	1,74	277,23	1449,40
	22:00	168		181					
6	10:00	167	166	177	172	0,35	1,85	159,88	841,70
	22:00	165		167					
7	10:00	162	161	158	151	0,38	1,97	173,32	896,46
	22:00	159		143					
8	10:00	154	142	139	128	0,48	2,10	220,04	953,98
	22:00	130		116					
9	10:00	115	111	115	113	0,66	2,18	298,54	989,40
	22:00	107		112					
10	10:00	107	106	110	110	0,68	2,20	309,97	998,57
	22:00	106		110					



## **ANEXO 3**

Quadros 1 a 7 – Resultados obtidos durante a Fase 3 para as várias idades de biofilme analisadas e para o ensaio contínuo.

- Valores expressos em DOC e CQO (valores registados e valores médios diários).
- Fluxos mássicos por unidade de área e por unidade de volume de biofilme.

Quadro 1 – Fase experimental 3 – Id 0,5 a 1

Dia de Ensaio	Hora de Recolha	DOC (mgC/l)	DOC md (mgC/l)	CQO (mgO <sub>2</sub> /l)	CQO md (mgO <sub>2</sub> /l)	Q (S0-S1)/A (mgDOC/m <sup>2</sup> .h)	Q (S0-S1)/A (mgCQO/m <sup>2</sup> .h)	Q (S0-S1)/V (mgDOC/m <sup>3</sup> .h)	Q (S0-S1)/V (mgCQO/m <sup>3</sup> .h)
1	22:00	510	381	999	764	0,08	0,54	395,12	2694,03
	4:00	500		844					
	10:00	481		805					
	16:00	227		662					
	22:00	190		510					
2	4:00	184	165	477	456	1,81	2,86	9040,75	14322,10
	10:00	175		454					
	16:00	155		450					
	22:00	148		445					
3	4:00	148	146	434	423	2,01	3,11	10027,18	15565,50
	10:00	145		429					
	16:00	145		424					
	22:00	145		407					
4	4:00	144	144	392	373	2,02	3,34	10091,69	16716,80
	10:00	144		384					
	16:00	144,		372					
	22:00	143		344					
5	4:00	142	142	335	308,58	2,03	3,72	10139,77	18604,92
	10:00	142		310					
	16:00	142		304					
	22:00	140		284					

Dia de Ensaio	Hora de Recolha	DOC (mgC/l)	DOC md (mgC/l)	CQO (mgO <sub>2</sub> /l)	CQO md (mgO <sub>2</sub> /l)	Q (S0-S1)/A (mgDOC/m <sup>2</sup> .h)	Q (S0-S1)/A (mgCQO/m <sup>2</sup> .h)	Q (S0-S1)/V (mgDOC/m <sup>3</sup> .h)	Q (S0-S1)/V (mgCQO/m <sup>3</sup> .h)
<b>6</b>	4:00	139	138	272	262	2,05	4,01	10243,39	20055,55
	10:00	138		265					
	16:00	138		260					
	22:00	137		250					
<b>7</b>	4:00	136	136	239	221	2,06	4,21	10318,55	21045,66
	10:00	136		227					
	16:00	135		214					
	22:00	135		204					
<b>8</b>	4:00	133	132	179,	171	2,08	4,49	10385,00	22473,27
	10:00	132		170					
	16:00	131		170					
	22:00	131		165					
<b>9</b>	4:00	127	126	174	163	2,11	4,60	10541,53	23002,86
	10:00	126		170					
	16:00	125		155					
	22:00	125		152					
<b>10</b>	4:00	126	126	159	163	2,12	4,67	10623,04	23348,25
	10:00	125		159					
	16:00	125		165					
	22:00	125		169					

Quadro 2 – Fase experimental 3 – Id 1 a 2

Dia de Ensaio	Hora de Recolha	DOC (mgC/l)	DOC md (mgC/l)	CQO (mgO <sub>2</sub> /l)	CQO md (mgO <sub>2</sub> /l)	Q (S0-S1)/A (mgDOC/m <sup>2</sup> .h)	Q (S0-S1)/A (mgCQO/m <sup>2</sup> .h)	Q (S0-S1)/V (mgDOC/m <sup>3</sup> .h)	Q (S0-S1)/V (mgCQO/m <sup>3</sup> .h)
1	10:00	510	445	1000	800	0,35	1,11	787,79	2456,09
	22:00	381		600					
2	10:00	294	254	525	467	1,41	2,95	3133,98	6549,59
	22:00	215		409					
3	10:00	175	175	347	339	1,85	3,65	4107,20	8115,35
	22:00	175		332					
4	10:00	164	166	240	240	1,90	4,20	4223,87	9333,16
	22:00	167		240					
5	10:00	159	150	212	269	1,99	4,04	4416,67	8974,98
	22:00	141		327					
6	10:00	140	137	259	220	2,06	4,31	4571,41	9578,77
	22:00	135		182					
7	10:00	129	129	179	189	2,11	4,49	4679,47	9967,65
	22:00	128		199					
8	10:00	127	128	172	174	2,11	4,57	4689,30	10151,86
	22:00	128		175					
9	10:00	129	128	175	171	2,11	4,58	4685,00	10182,56
	22:00	128		167					
10	10:00	127	128	185	172	2,11	4,58	4689,30	10172,33
	22:00	128		159					

Quadro 3 – Fase experimental 3 – Id 2 a 3

Dia de Ensaio	Hora de Recolha	DOC (mgC/l)	DOC md (mgC/l)	CQO (mgO <sub>2</sub> /l)	CQO md (mgO <sub>2</sub> /l)	Q (S0-S1)/A (mgDOC/m <sup>2</sup> .h)	Q (S0-S1)/A (mgCQO/m <sup>2</sup> .h)	Q (S0-S1)/V (mgDOC/m <sup>3</sup> .h)	Q (S0-S1)/V (mgCQO/m <sup>3</sup> .h)
1	10:00	510	435	1000	820	0,41	0,99	690,78	1657,86
	22:00	360		640					
2	10:00	215	193	574	564	1,75	2,41	2919,68	4021,86
	22:00	170		554					
3	10:00	175	168	494	474	1,89	2,91	3143,49	4850,79
	22:00	161		454					
4	10:00	161	159	415	371	1,94	3,48	3232,83	5794,85
	22:00	156		327					
5	10:00	143	135	245	231	2,07	4,25	3452,50	7084,30
	22:00	127		217					
6	10:00	126	128	192	183	2,11	4,52	3518,82	7529,47
	22:00	129		174					
7	10:00	125	127	185	170	2,12	4,59	3527,11	7644,60
	22:00	128		155					
8	10:00	128	128	200	172	2,11	4,58	3519,28	7629,24
	22:00	127		144					
9	10:00	126	127	179	170	2,11	4,59	3523,42	7644,60
	22:00	128		162					
10	10:00	128	128	175	171	2,11	4,58	3518,82	7636,92
	22:00	127		167					

Quadro 4 – Fase experimental 3 – Id 3 a 4

Dia de Ensaio	Hora de Recolha	DOC (mgC/l)	DOC md (mgC/l)	CQO (mgO <sub>2</sub> /l)	CQO md (mgO <sub>2</sub> /l)	Q (S0-S1)/A (mgDOC/m <sup>2</sup> .h)	Q (S0-S1)/A (mgCQO/m <sup>2</sup> .h)	Q (S0-S1)/V (mgDOC/m <sup>3</sup> .h)	Q (S0-S1)/V (mgCQO/m <sup>3</sup> .h)
1	10:00	510	350	1000	656,5	0,88	1,90	980,90	2113,26
	22:00	190		312					
2	10:00	178	178	524	397	1,83	3,33	2035,80	3704,61
	22:00	178		270					
3	10:00	175	175	262	261	1,85	4,08	2057,29	4538,66
	22:00	175		260					
4	10:00	159	154	249	247	1,97	4,16	2183,78	4625,65
	22:00	149		245					
5	10:00	144	142	242	236	2,03	4,22	2258,99	4692,16
	22:00	140		230					
6	10:00	136	133	225	221	2,08	4,31	2312,23	4784,27
	22:00	130		217					
7	10:00	128	128	214	213	2,11	4,35	2344,59	4835,44
	22:00	127		212					
8	10:00	126	126	212	212	2,12	4,36	2356,53	4840,55
	22:00	126		212					
9	10:00	126	126	212	210	2,12	4,37	2357,54	4850,79
	22:00	126		209					
10	10:00	126	126	210	211	2,12	4,36	2357,61	4845,67
	22:00	126		212					



Quadro 5 – Fase experimental 3 – Id 4 a 5

Dia de Ensaio	Hora de Recolha	DOC (mgC/l)	DOC md (mgC/l)	CQO (mgO <sub>2</sub> /l)	CQO md (mgO <sub>2</sub> /l)	Q (S0-S1)/A (mgDOC/m <sup>2</sup> .h)	Q (S0-S1)/A (mgCQO/m <sup>2</sup> .h)	Q (S0-S1)/V (mgDOC/m <sup>3</sup> .h)	Q (S0-S1)/V (mgCQO/m <sup>3</sup> .h)
1	10:00	510	351	1000	932	0,87	0,38	729,00	314,69
	22:00	193		864					
2	10:00	188	185	767	674	1,79	1,81	1495,07	1504,36
	22:00	182		580					
3	10:00	167	165	462	437	1,90	3,11	1587,17	2594,25
	22:00	163		412					
4	10:00	157	153	399	389	1,97	3,38	1641,75	2813,00
	22:00	149		380					
5	10:00	142	139	337	332	2,05	3,69	1707,37	3077,79
	22:00	136		327					
6	10:00	136	134	299	291	2,08	3,92	1730,17	3265,84
	22:00	132		284					
7	10:00	131	128	254	239	2,11	4,20	1756,65	3503,77
	22:00	126		225					
8	10:00	128	126	197	190	2,12	4,48	1766,32	3730,19
	22:00	124		184					
9	10:00	125	127	177	177	2,12	4,55	1762,63	3791,60
	22:00	129		177					
10	10:00	127	127	177	177	2,11	4,55	1762,17	3791,60
	22:00	127		177					

Quadro 6 – Fase experimental 3 – Id 5 a 6

Dia de Ensaio	Hora de Recolha	DOC (mgC/l)	DOC md (mgC/l)	CQO (mgO <sub>2</sub> /l)	CQO md (mgO <sub>2</sub> /l)	Q (S0-S1)/A (mgDOC/m <sup>2</sup> .h)	Q (S0-S1)/A (mgCQO/m <sup>2</sup> .h)	Q (S0-S1)/V (mgDOC/m <sup>3</sup> .h)	Q (S0-S1)/V (mgCQO/m <sup>3</sup> .h)
1	10:00	510	309	1000	891	0,89	0,60	403,01	274,22
	22:00	189		782					
2	10:00	185		727					
	22:00	180,	182	562	644	1,81	1,97	822,31	893,82
3	10:00	163		429					
	22:00	160	162	390	409	1,92	3,27	874,07	1484,12
4	10:00	155		367					
	22:00	150	152	347	357	1,97	3,56	897,43	1616,00
5	10:00	140		320					
	22:00	133	136	290	305	2,06	3,84	937,86	1745,78
6	10:00	132		274					
	22:00	132	132	254	264	2,09	4,07	948,62	1850,44
7	10:00	130		250					
	22:00	125	127	227	239	2,11	4,21	960,05	1913,24
8	10:00	127		197					
	22:00	124	125	164	180	2,12	4,53	965,20	2059,77
9	10:00	125		174					
	22:00	126	126	180	177	2,12	4,55	964,32	2068,14
10	10:00	126		174					
	22:00	126	126	180	177	2,12	4,55	963,57	2068,14

Quadro 7 – Fase experimental 3 – Ensaio contínuo

Dia de Ensaio	Hora de Recolha	DOC (mgC/l)	DOC md (mgC/l)	CQO (mgO <sub>2</sub> /l)	CQO md (mgO <sub>2</sub> /l)	Q (S0-S1)/A (mgDOC/m <sup>2</sup> .h)	Q (S0-S1)/A (mgCQO/m <sup>2</sup> .h)	Q (S0-S1)/V (mgDOC/m <sup>3</sup> .h)	Q (S0-S1)/V (mgCQO/m <sup>3</sup> .h)
1	10:00	510	496	1000	903	0,08	0,54	395,82	2693,94
	22:00	481		805					
2	10:00	399	391	600	578	0,66	2,33	1465,06	5188,21
	22:00	381,		555					
3	10:00	285	247	463	431	1,45	3,14	2418,18	5241,31
	22:00	209		399					
4	10:00	175	171	329	312	1,87	3,80	2080,93	4224,28
	22:00	166		295					
5	10:00	160	157	287	270	1,95	4,04	1625,86	3363,24
	22:00	153		253					
6	10:00	140	136	249	244	2,07	4,18	939,46	1899,05
	22:00	131		239					
7	10:00	127	126	222	221	2,12	4,31	964,20	1958,58
	22:00	125		219					
8	10:00	124	126	200	197	2,13	4,44	968,97	2019,24
	22:00	124		193					
9	10:00	124	124	185	183	2,13	4,52	969,47	2053,66
	22:00	124		180					
10	10:00	124	124	179	179	2,13	4,54	969,98	2062,32
	22:00	124		179					

